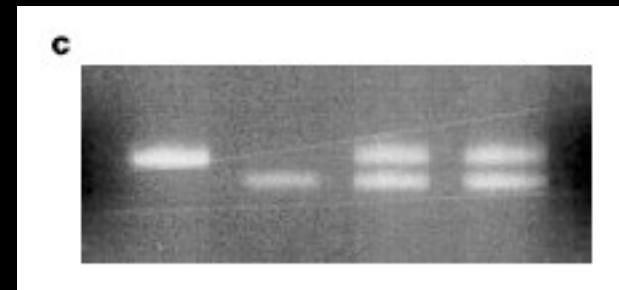
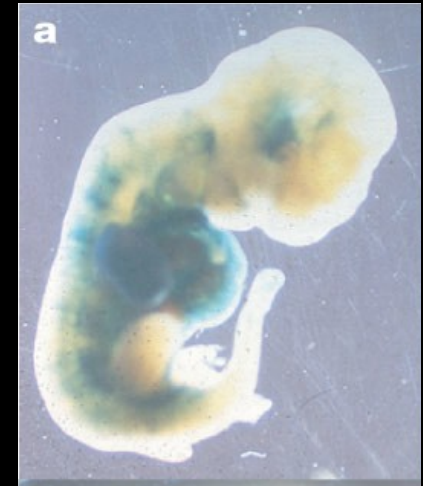
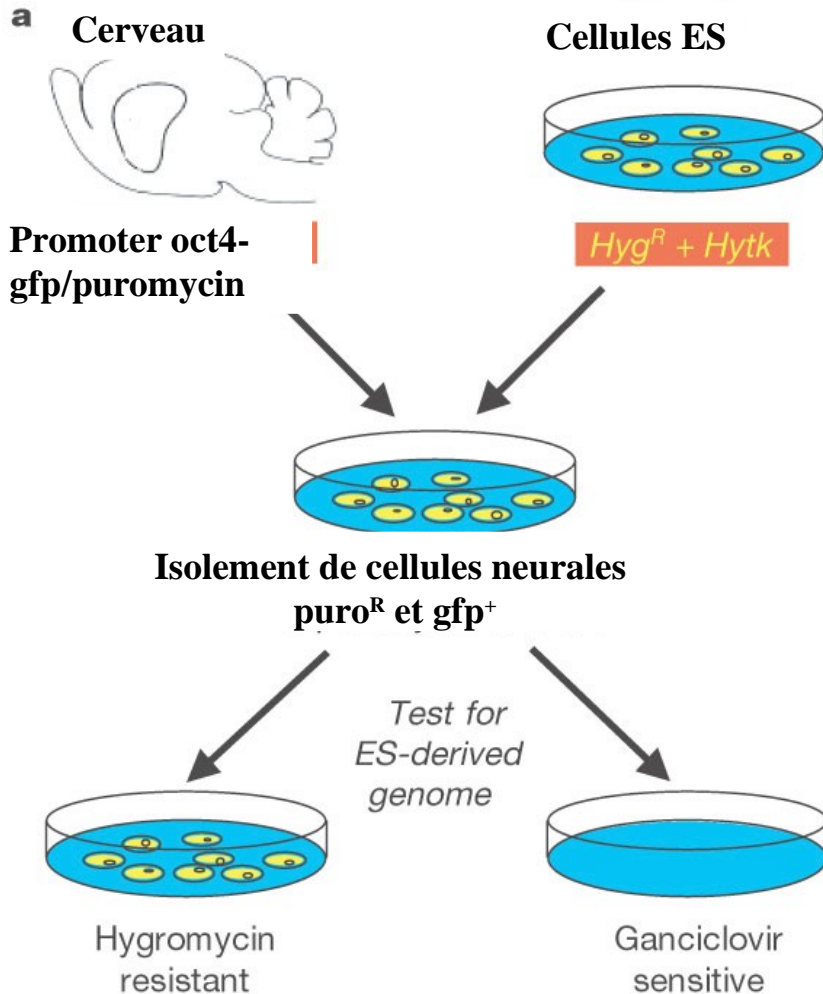


cell fusion causes confusion!

NATURE | VOL 416 | 4 APRIL 2002 | www.nature.com

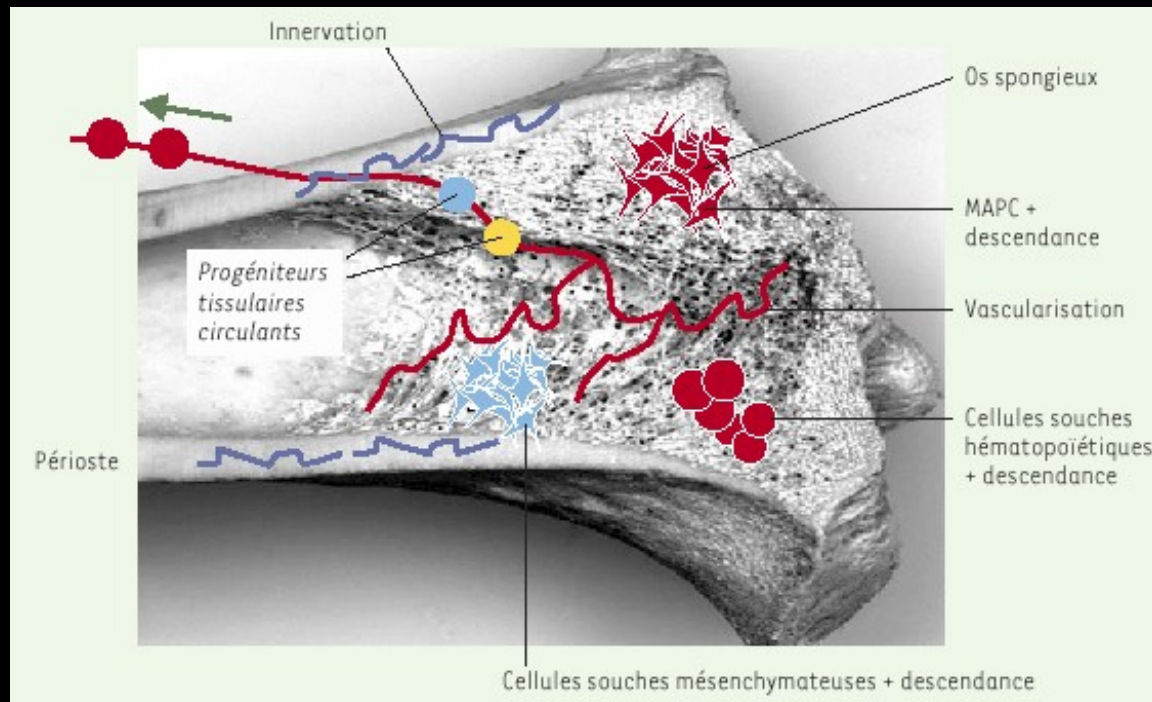
Changing potency by spontaneous fusion

Qi-Long Ying⁺, Jennifer Nichols⁺, Edward P. Evans[†] & Austin G. Smith⁺



Malheureusement, l'Homme n'est ni une hydre, ni une salamandre...

- Fusion cellulaire
- Contaminant de cellules circulantes
- Population hétérogène (non clonale)



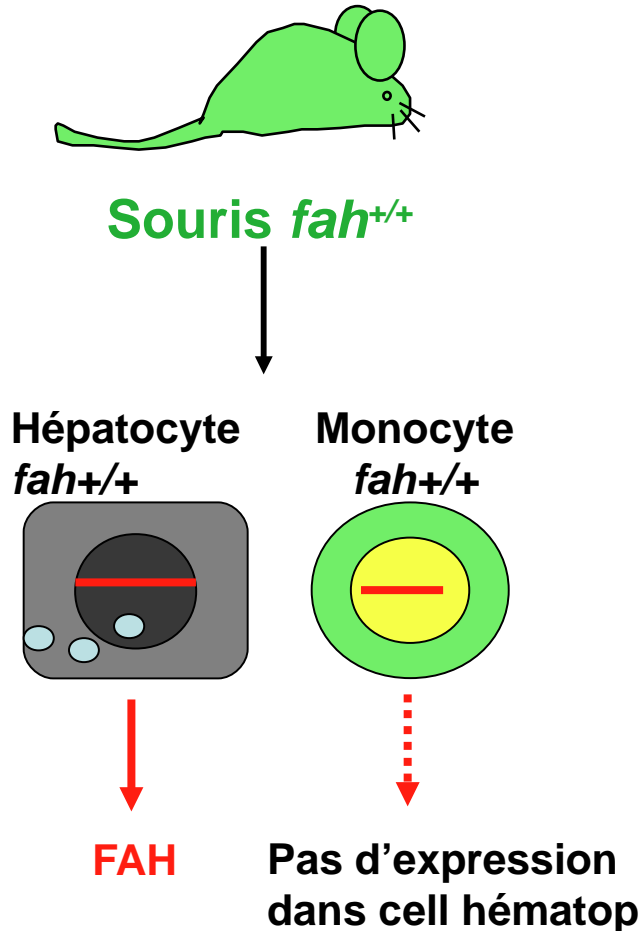
Pathologie létale du métabolisme hépatique

Absence de l'enzyme Fah (fumarylacetoacetate hydroxylase)

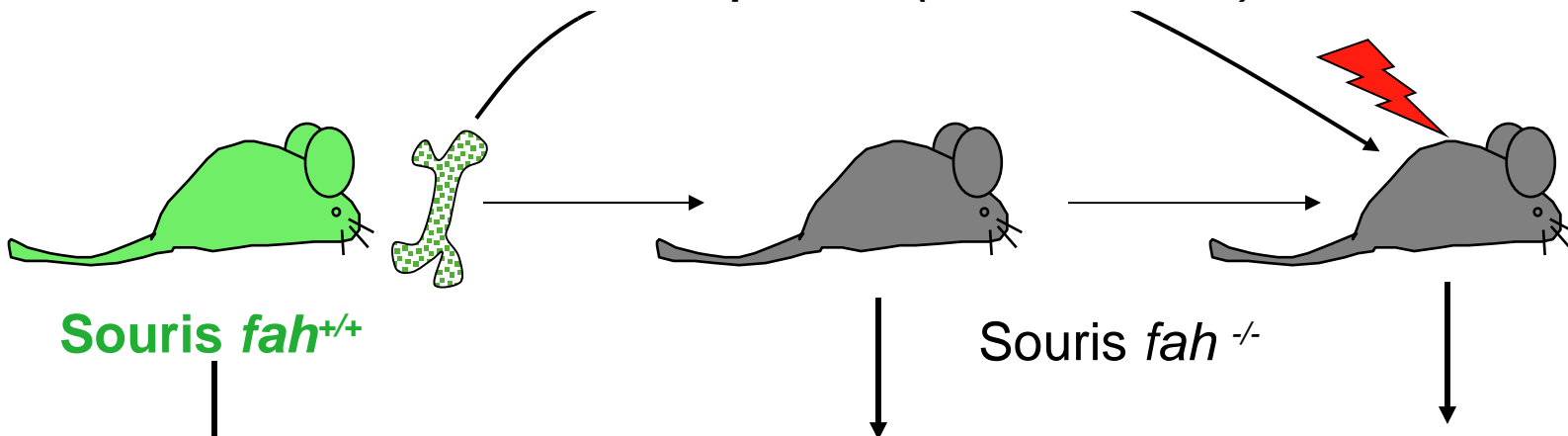
Réversion phénotypique par transplantation de CSH

(Wang *et al.* (2003) *Nature* 422, 897-901)

(Vassilopoulos *et al.* (2003) *Nature* 422, 901-904)



**Greffe de Cellules Souches
Hématop *fah*^{+/+} (*c-kit*⁺*Lin*⁻*Sca1*⁺)**



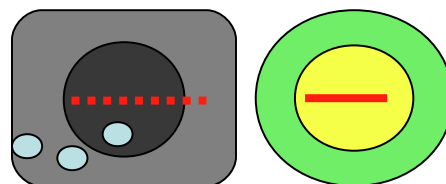
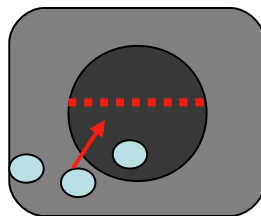
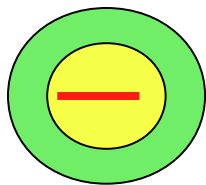
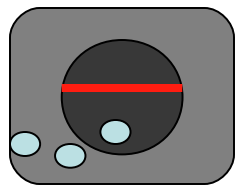
Souris *fah*^{+/+}

Souris *fah*^{-/-}

**Hépatocyte
fah^{+/+}**

**Monocyte
fah^{+/+}**

**Hépatocyte B
fah^{-/-}**



FAH

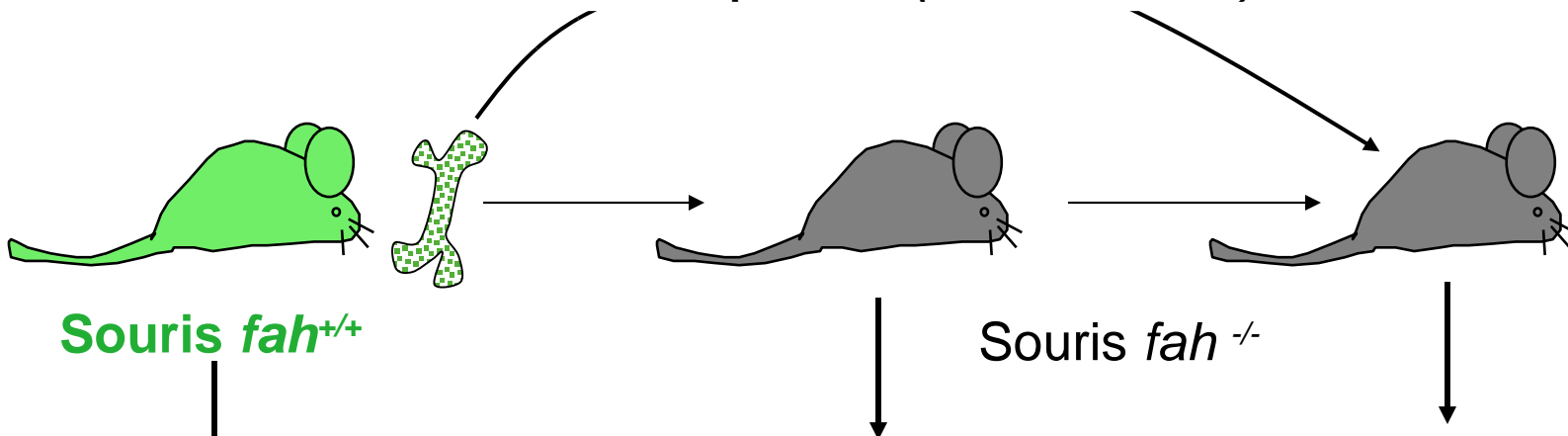
**Pas d'expression
dans cell hématop**

**Cytolyse
Mort**

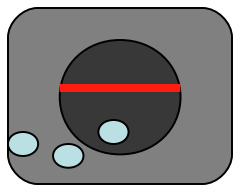
**FAH
Guérison**

FAH : fumaroacetate hydroxylase

**Greffe de Cellules Souches
Hématop *fah*^{+/+} (*c-kit*⁺*Lin*⁻*Sca1*⁺)**

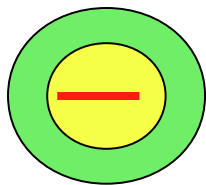


Hépatocyte
fah^{+/+}



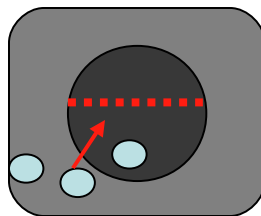
↓
FAH

Monocyte
fah^{+/+}



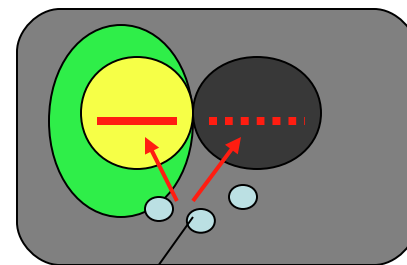
↓
Pas d'expression
dans cell hématop

Hépatocyte B
fah^{-/-}



↓
Cytolyse
Mort

Fusion Mo **A** *fah*^{+/+}
X hépatocyte B *fah*^{-/-}

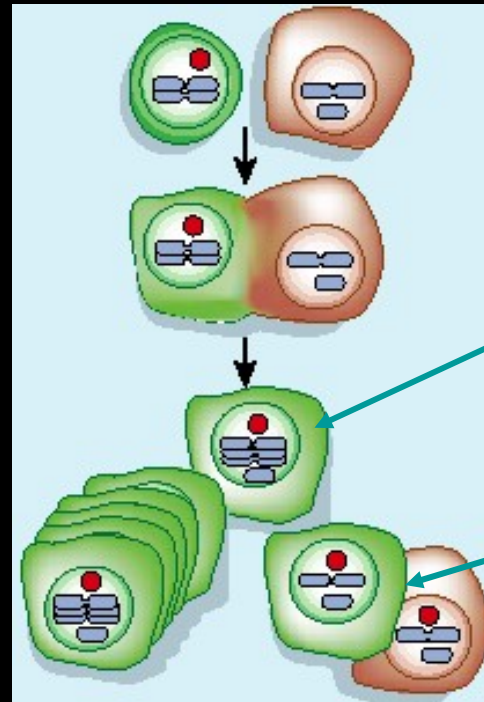


Facteurs
régulateurs

↓
FAH
Guérison

FAH : fumaroacetate hydroxylase

Fusion cellulaire



Cellule hybride
polyploïde

Division
réductionnelle

Difficultés de démontrer qu'une cellule est souche:

-Nécessité de caractériser sa descendance in vitro et/ou in vivo (vérification indirecte et rétrospective)

mais:

-Placer la cellule dans des conditions expérimentales qui lui permettent d'exprimer toutes ses capacités de prolifération et de différenciation:

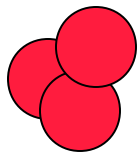
Comment le faire puisqu'on ne connaît pas a priori ces conditions!!

Comment être sûr qu'on altère pas les propriétés des CS en les manipulant?

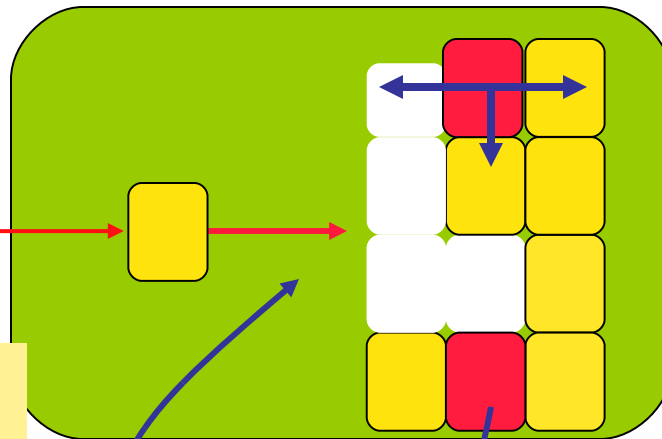
- Analyser ces cellules individuellement (à l'échelle clonale) à cause de l'hétérogénéité des tissus d'origine et l'impossibilité de purification à l'échelle de la cellule souche.

Stratégies de réparation tissulaire par des cellules souches

Stimulation de cellules souches
tissulaires endogènes
(spontanée ou induite)

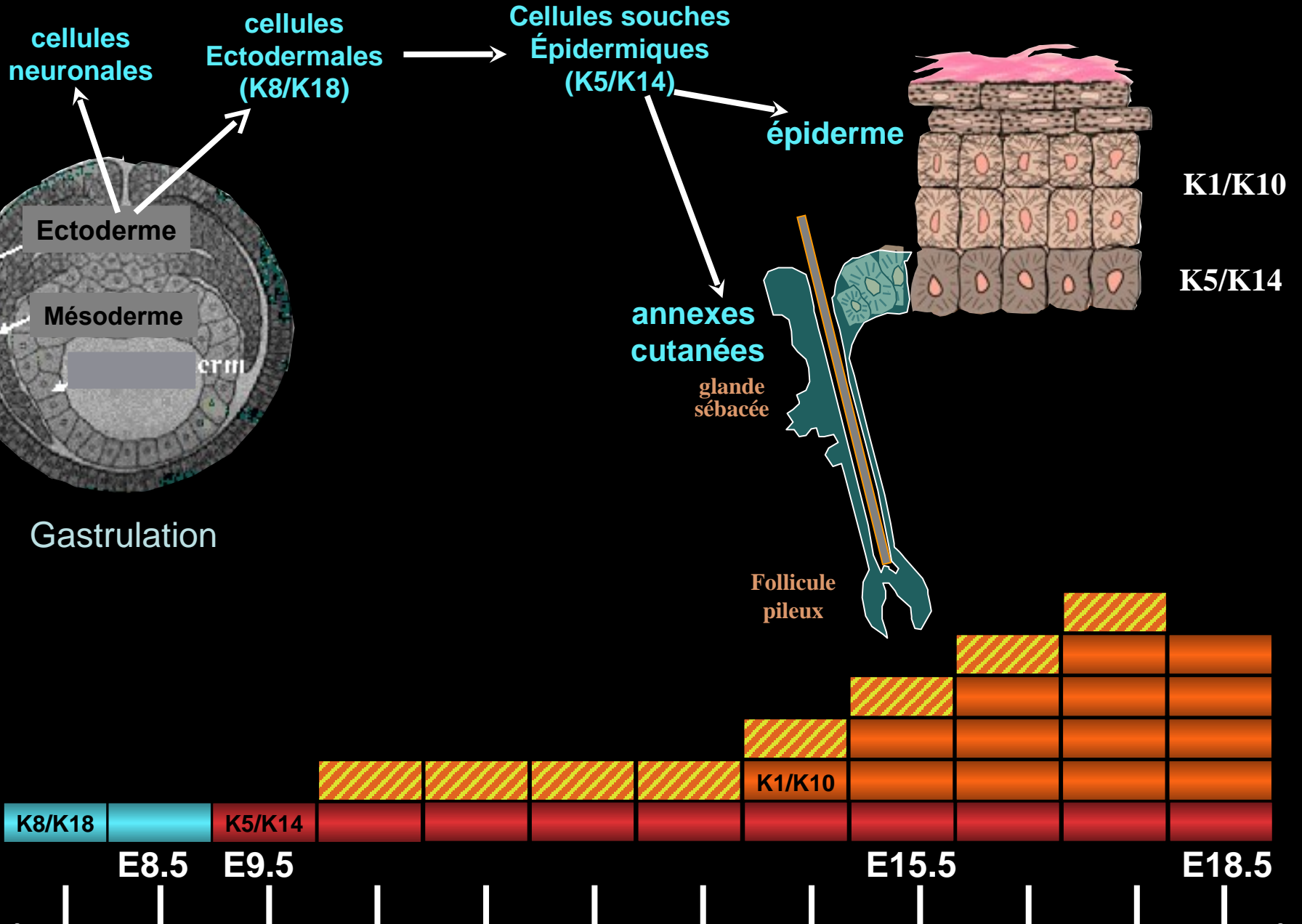


Apport de cellules souches
généralistes exogènes
(voie systémique ou locale)



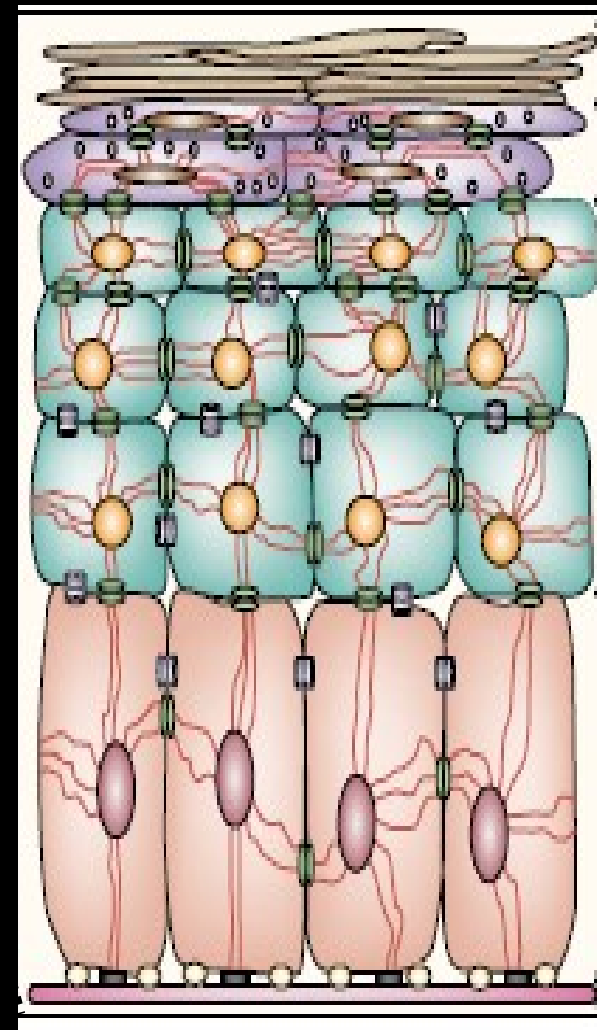
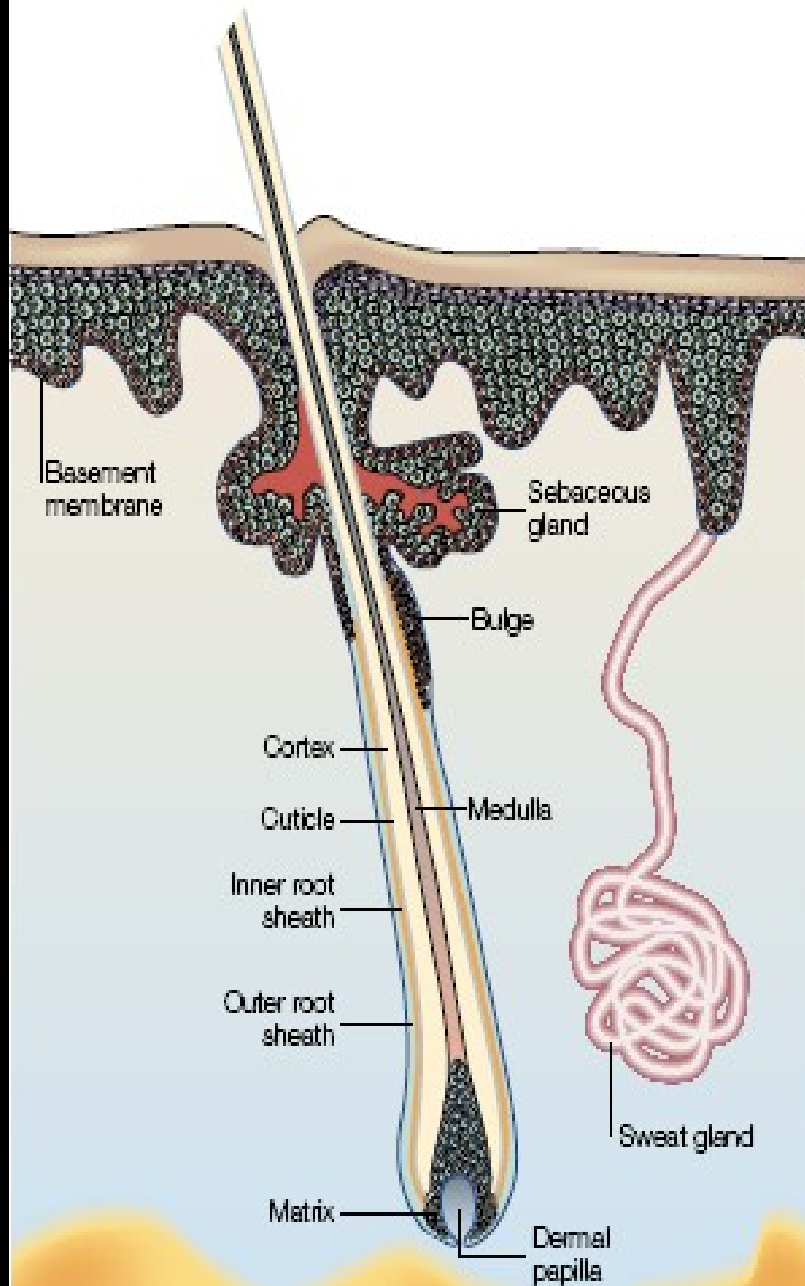
Amplification/stimulation
ex vivo de cellules souches
endogènes

Lignages épidermiques au cours de l'embryogenèse

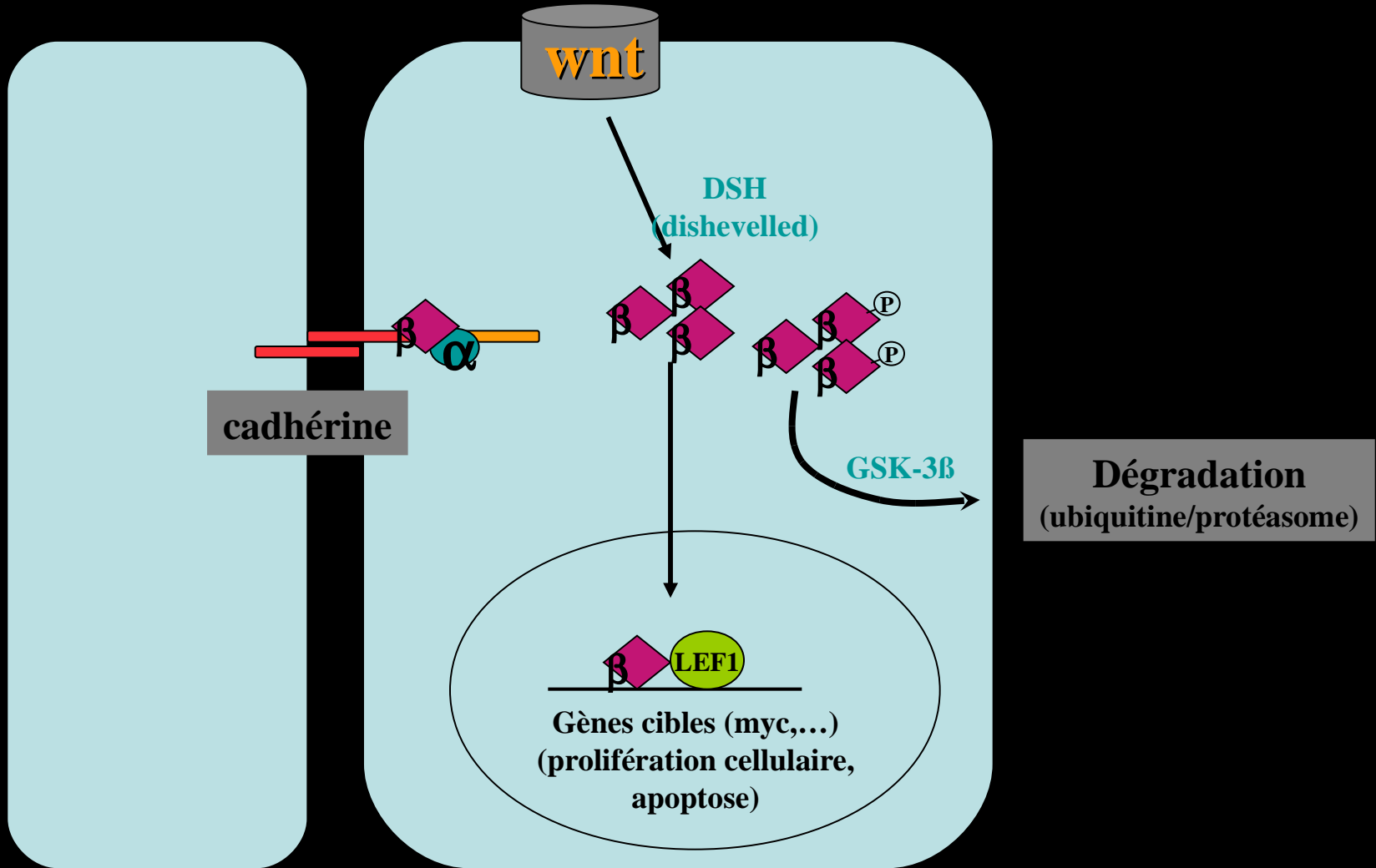


La production de souris transgéniques a permis d'identifier des gènes directement impliqués dans la formation et le renouvellement de l'épithélium cutané, dans son maintien et dans l'engagement folliculaire et sébocyttaire:

p63, c-myc, beta-caténine, LEF1



Beta-caténine



De Novo Hair Follicle Morphogenesis and Hair Tumors in Mice Expressing a Truncated β -Catenin in Skin

L'expression constitutive de la β -caténine accélère la production massive de nouveaux poils (qui normalement se forment eu cours de l'embryogénèse), mais désorganisée aboutissant à la formation de pilocarcinomes, trichofolliculomes et pilomatricomes.

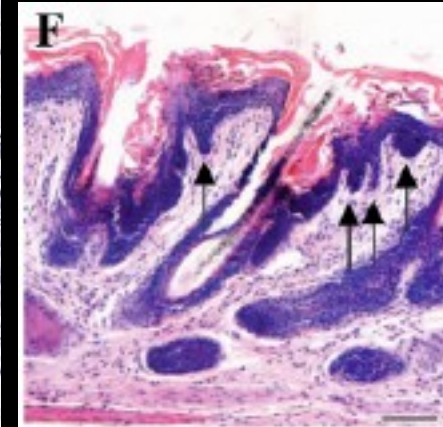
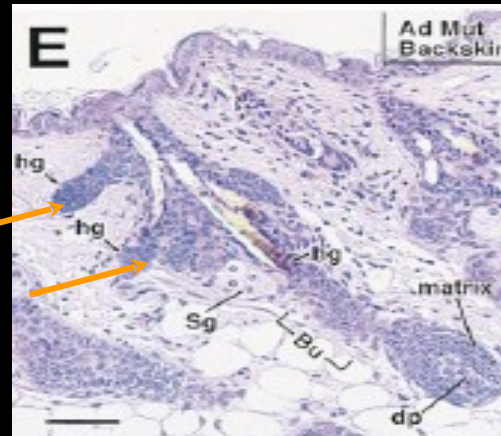
Souris sauvage



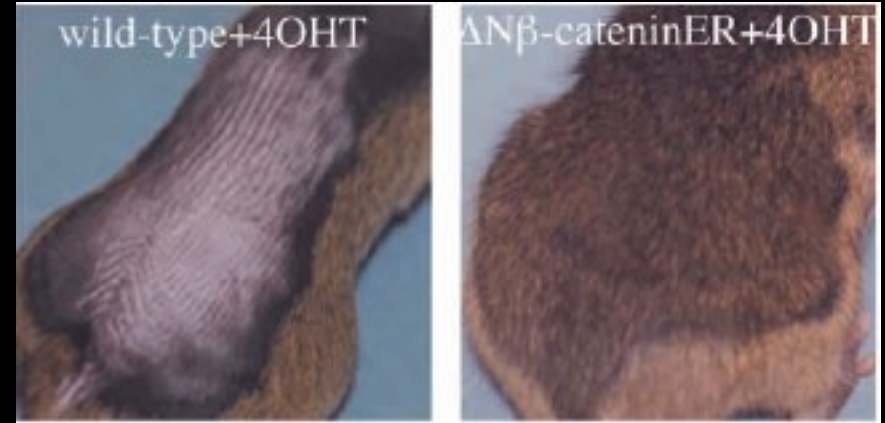
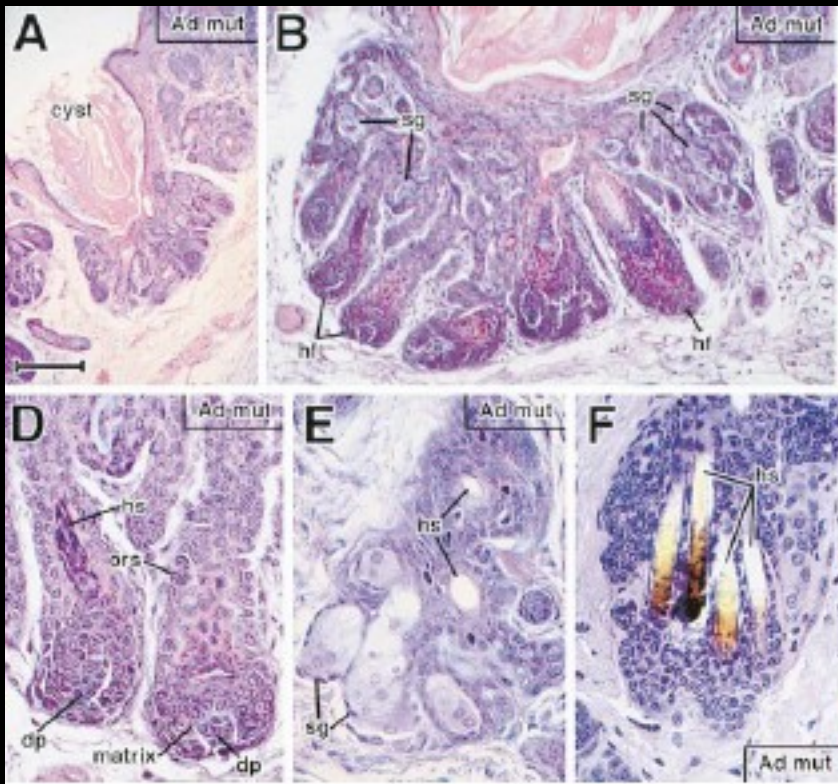
Souris transgénique (constitutive β -cat)



Peau plus épaisse et poils plus touffus

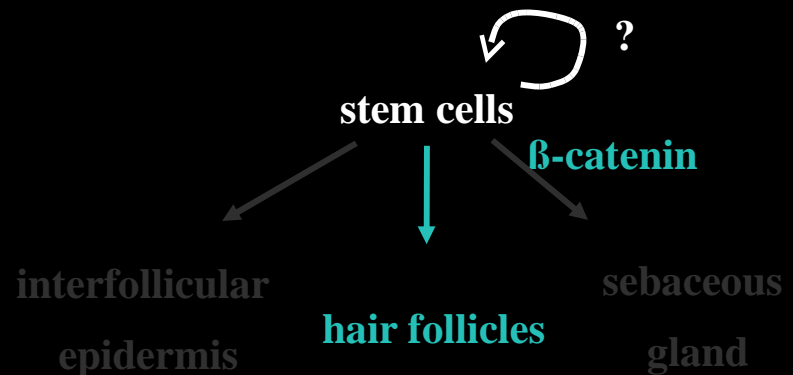


Formation de novo de follicules pileux dans l'épiderme interfolliculaire



Formation à partir de l'épiderme de multiples follicules pileux désorganisés, non orientés qui forment des cystes. Au début, la différenciation est normale mais au fur et à mesure, la non polarité des invaginations aboutit à la formation de trichofollicules (semblable aux pathologies humaines). Ces cystes expliquent l'épaisseur de la peau des souris.

A 6 semaines, le poil des souris est au repos (phase anagène) et ne repousse pas. Par contre, pour les souris transgéniques, une complète croissance de novo des poils a lieu en 14 jours.



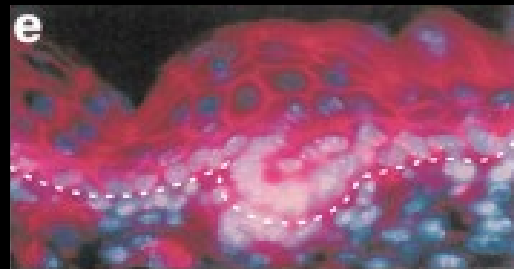
β -Catenin Controls Hair Follicle Morphogenesis and Stem Cell Differentiation in the Skin

Joerg Huelsken,¹ Regina Vogel,¹
Bettina Erdmann,¹ George Cotsarelis,²
and Walter Birchmeier^{1,3}
¹Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine

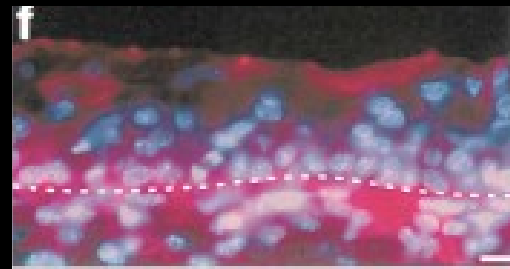
Souris sauvage



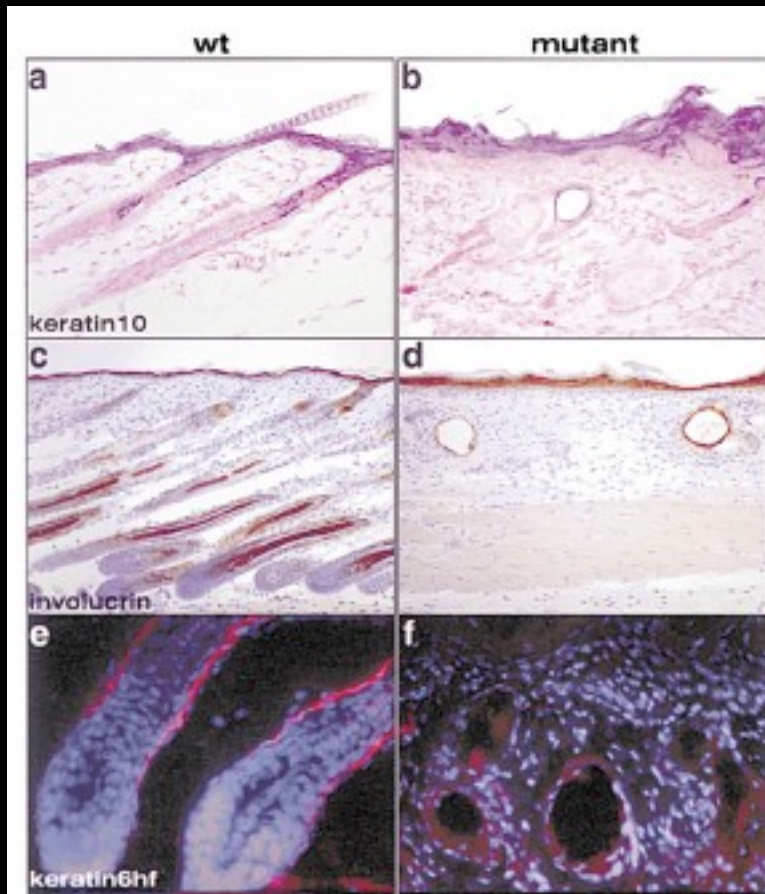
Souris KO β -cat)



β -caténine

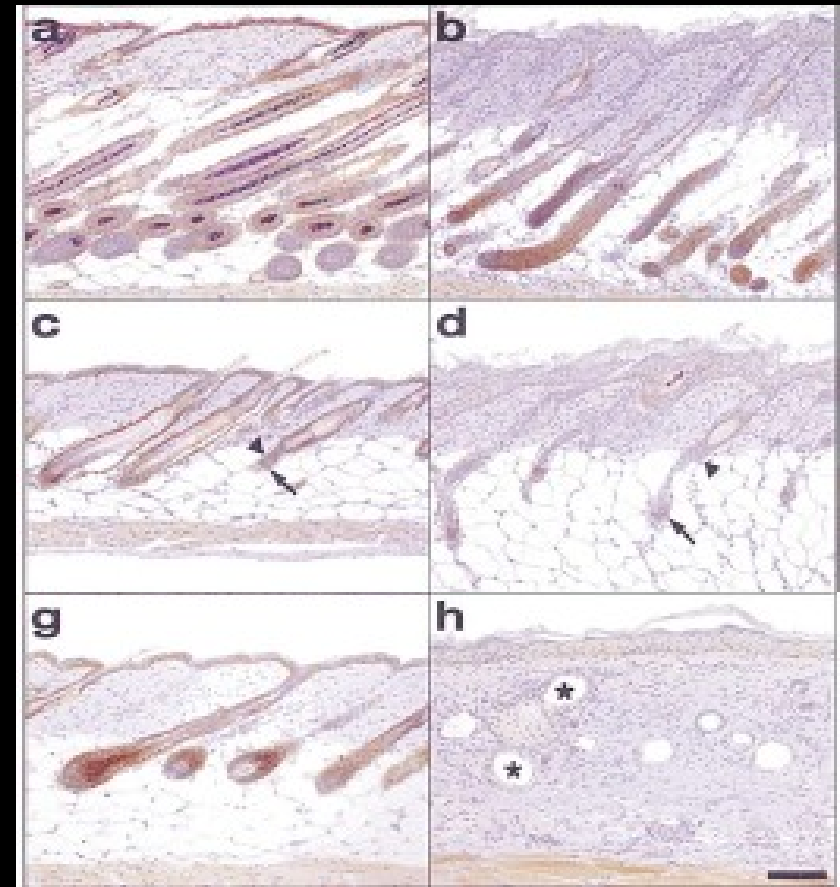


KO de β -cat avant la formation des f. pileux:



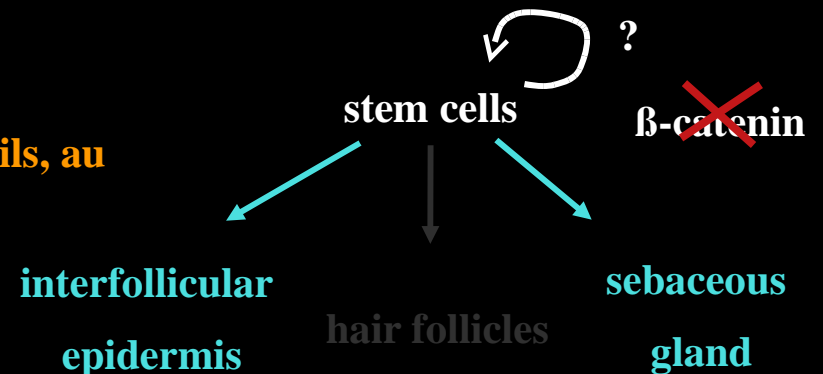
absence de placodes, épaissement de l'épiderme

KO de β -cat après la formation des f. pileux:

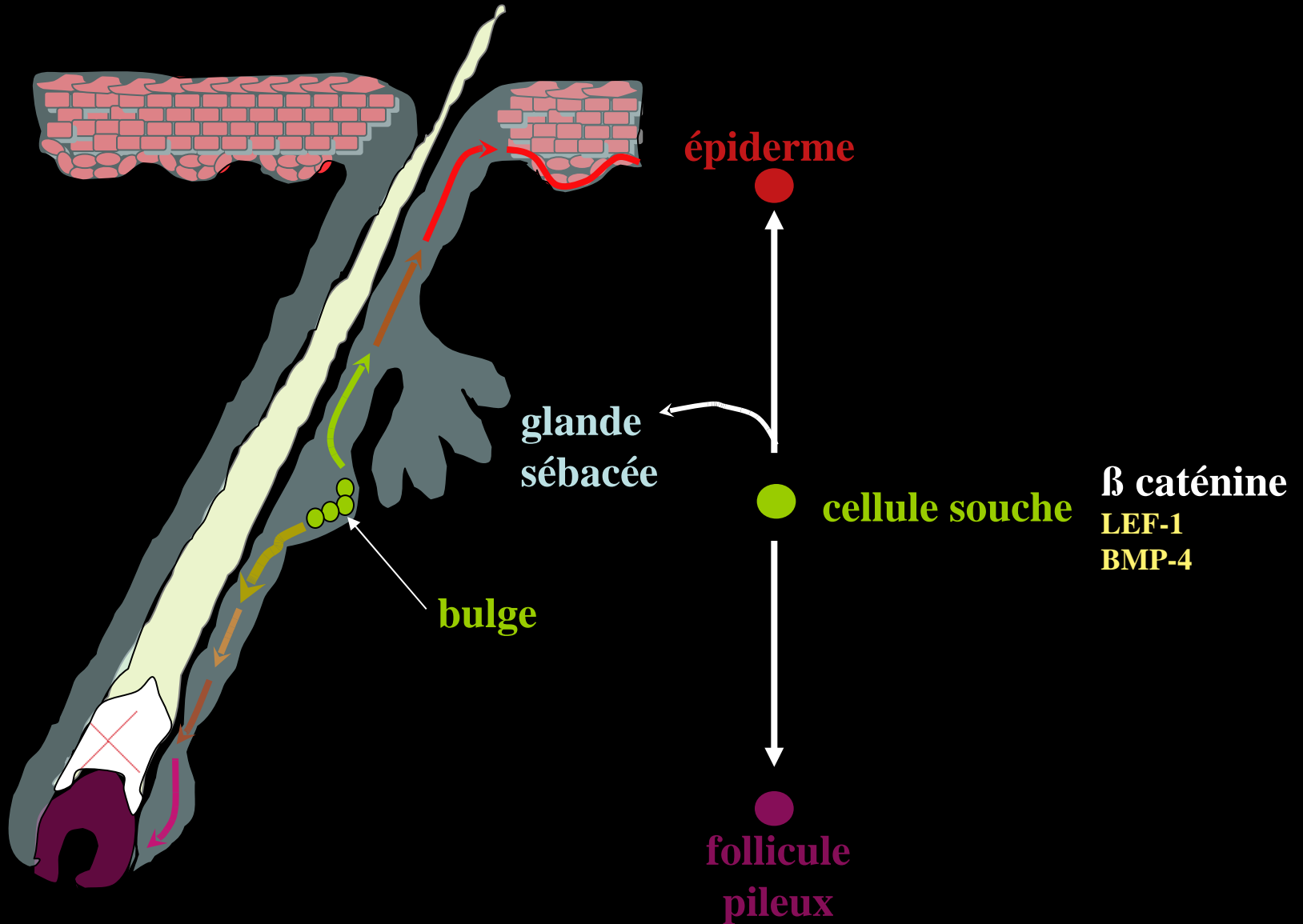


les poils sont totalement perdus après le premier cycle pileux.

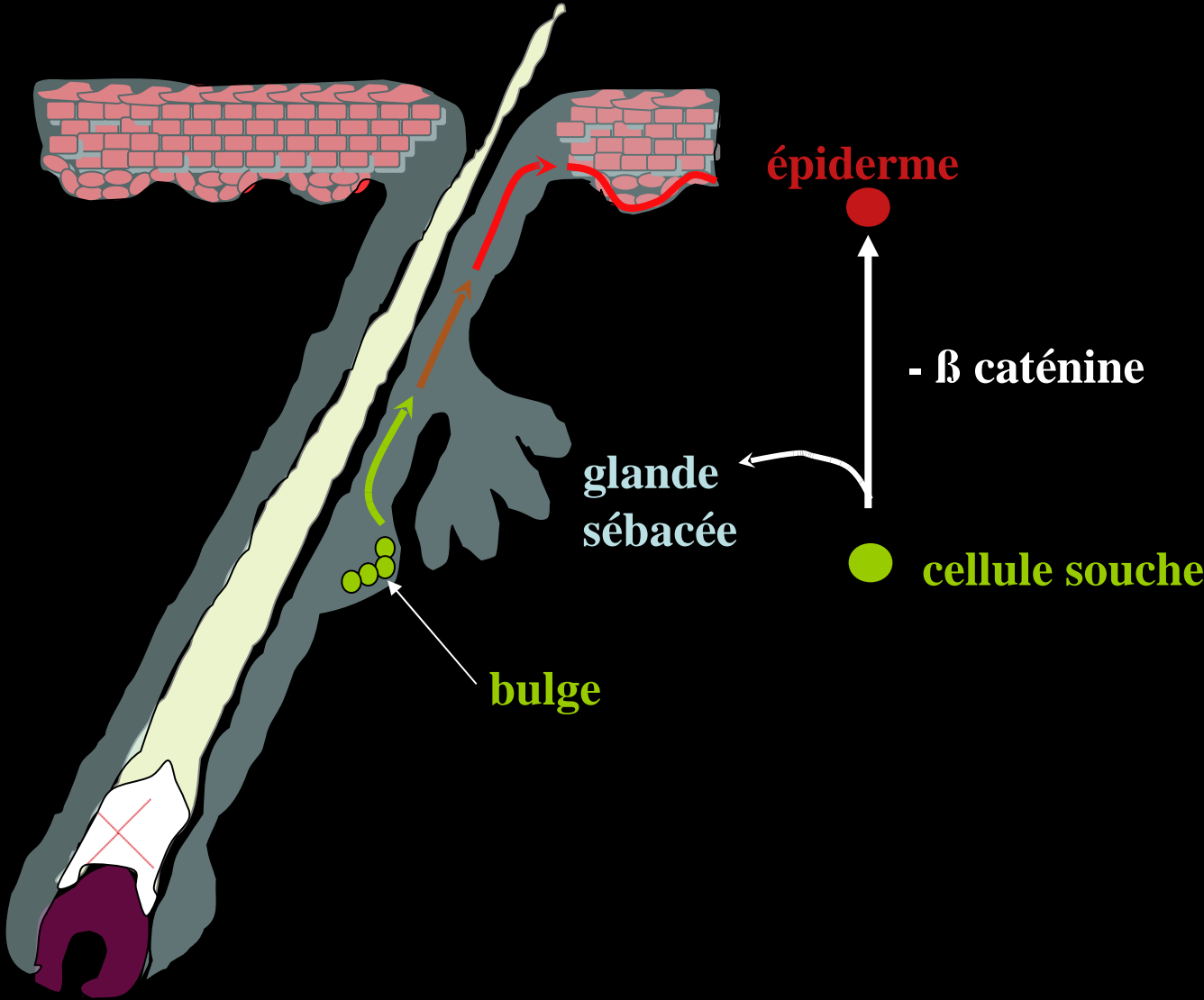
β -caténine est essentielle dans l'engagement des SC: en son absence, les SC ne peuvent se différencier en poils, au profit de l'épiderme.



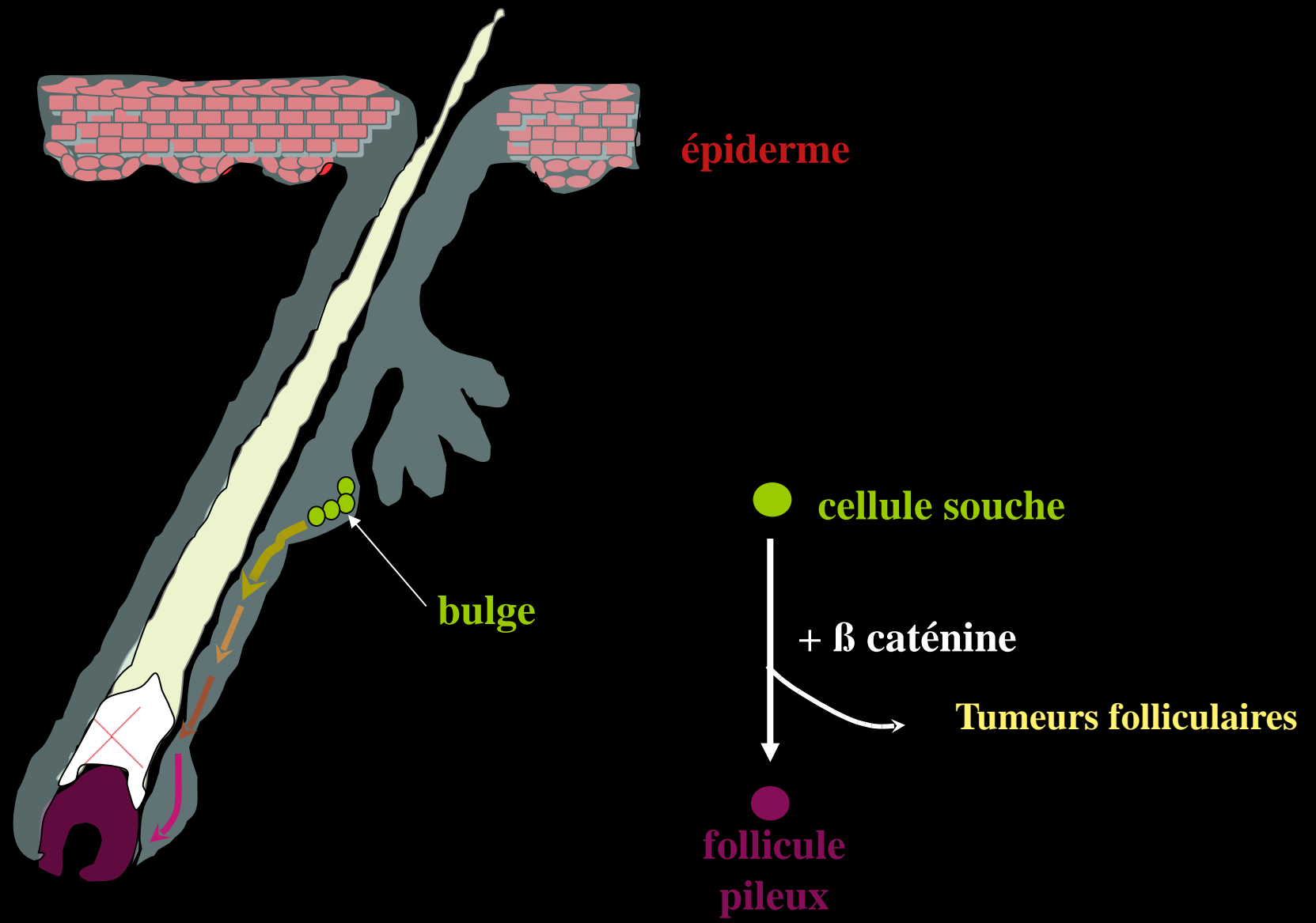
Rôle majeur de la β caténine dans la formation de l'épiderme et des annexes



Rôle majeur de la β caténine dans la formation de l'épiderme et des annexes



Rôle majeur de la β caténine dans la formation de l'épiderme et des annexes

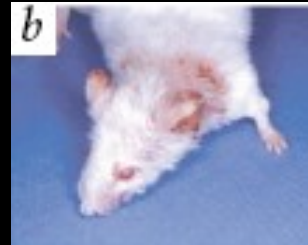


Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells

Rebekah L. Waikel¹, Yasuhiro Kawachi¹, Patricia A. Waikel¹, Xiao-Jing Wang^{1,2} & Dennis R. Roop^{1,2}

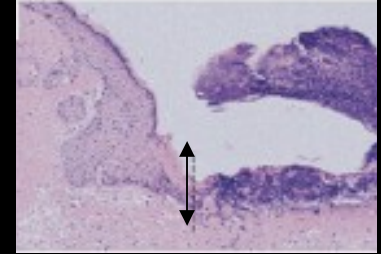
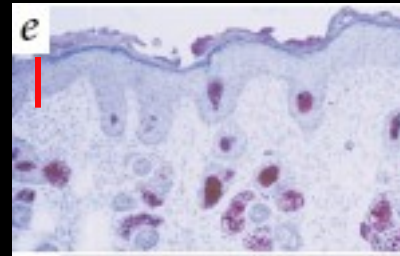
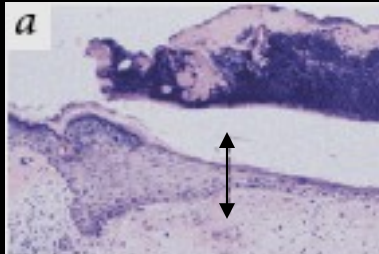
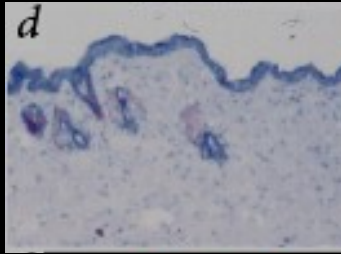
c-myc (oncogène, TF, prolifération, croissance cellulaire et différenciation)

Les souris adultes perdent progressivement leurs poils et développent des plaies chroniques.



Souris sauvage

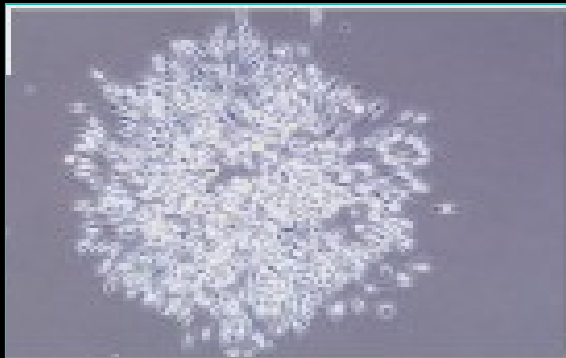
Souris transgénique



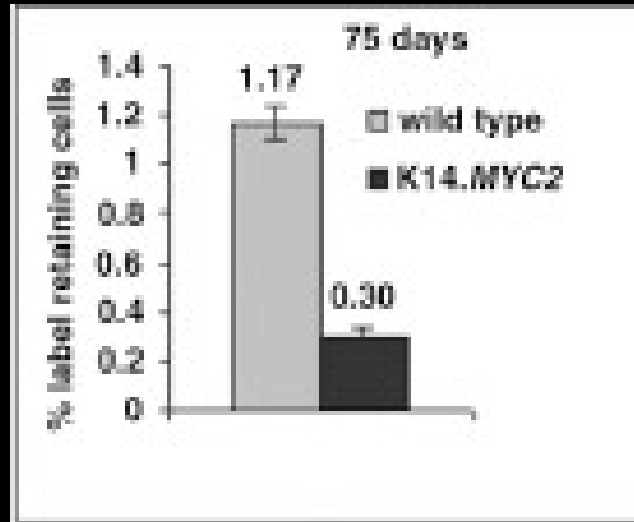
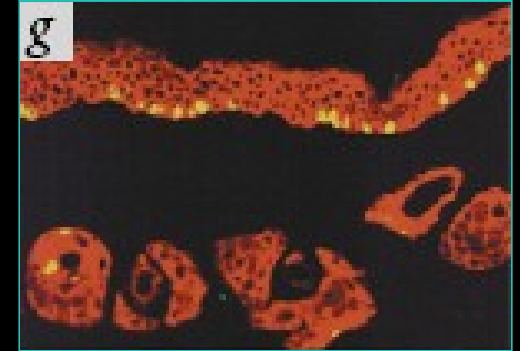
Augmentation de la fonction sébocytaire (red oil)

Hyperplasie épidermique; disparition locale d'épiderme

Souris sauvage



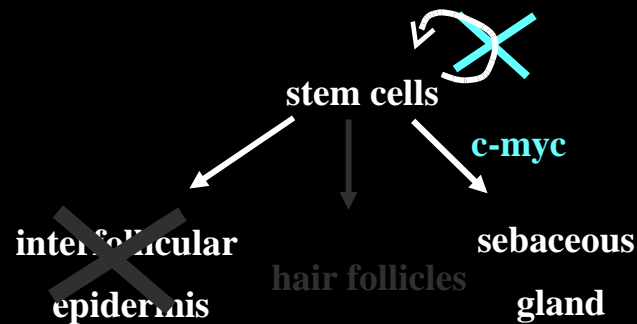
Souris transgénique



Augmentation de la prolifération (BrdU)

Réduction de 75% du nombre de CSE.

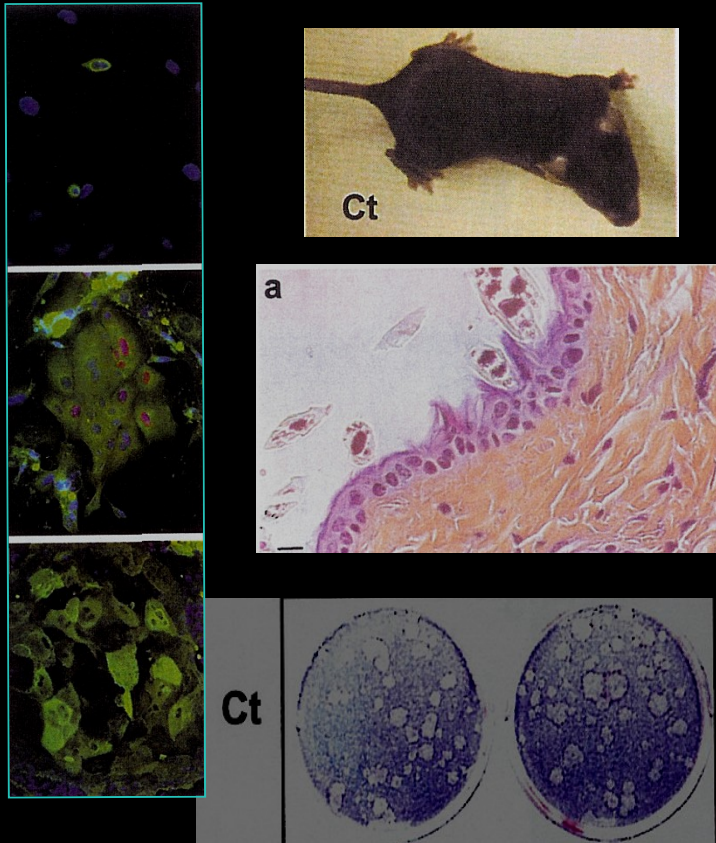
c-Myc est essentiel au maintien du pool souche.



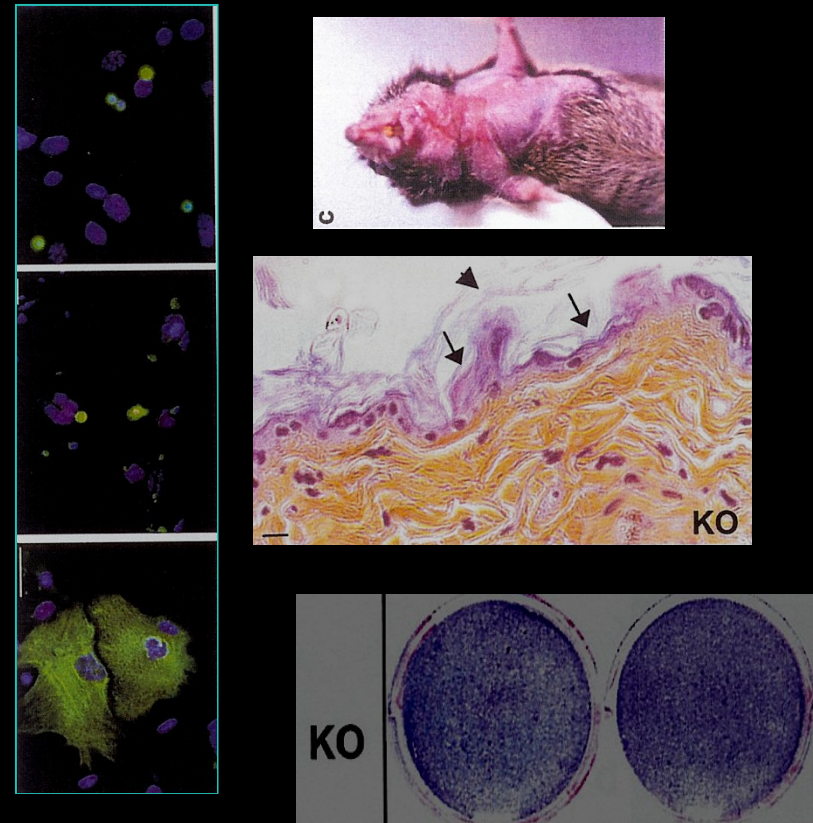
Endogenous c-myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, and stem cell amplification.

Zanet J., Pibre S., jacquet C., Ramirez A., MorenodeAlboran I. and Gandarillas A. (2005) J Cell Sciences, in press.

Souris sauvage



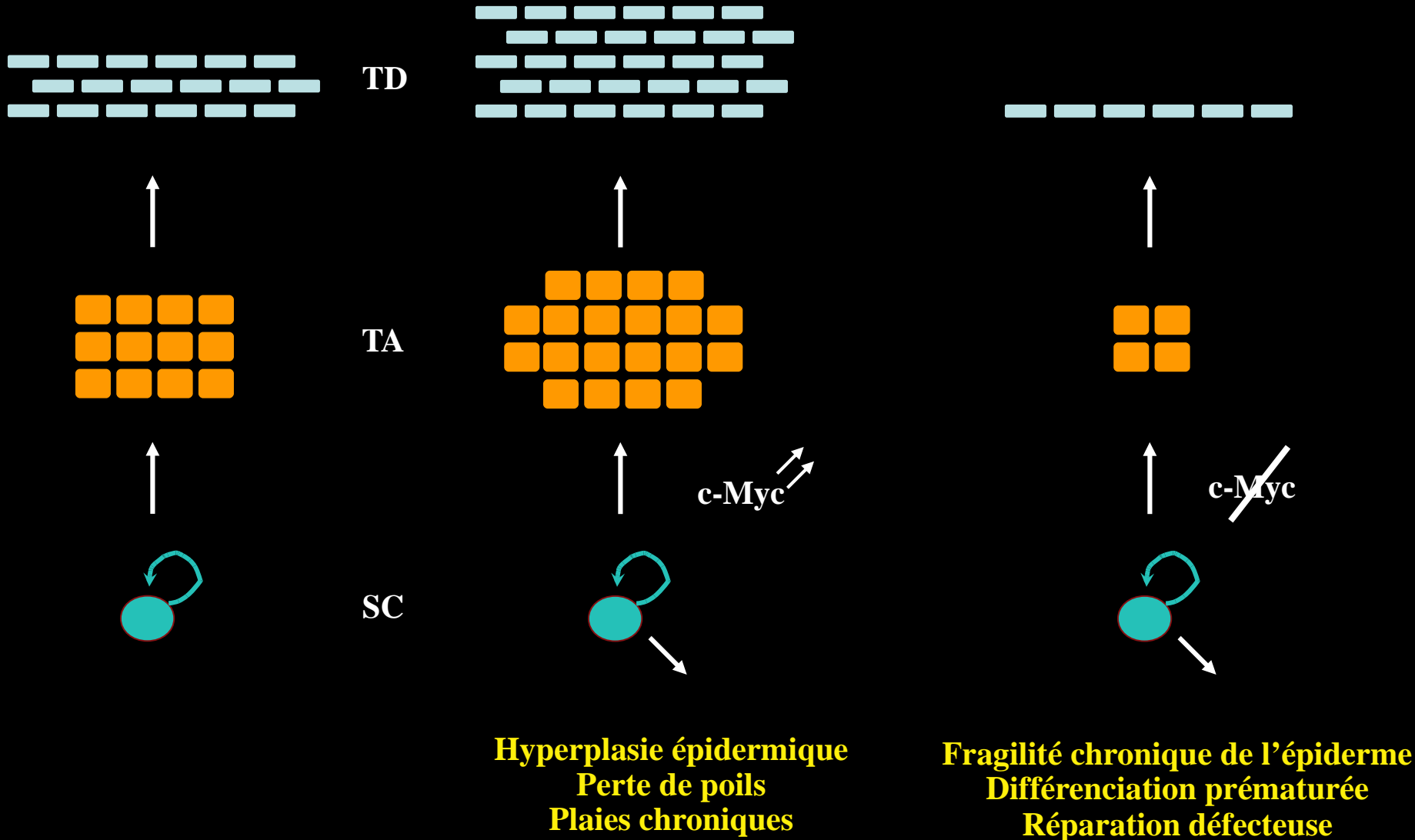
Souris transgénique

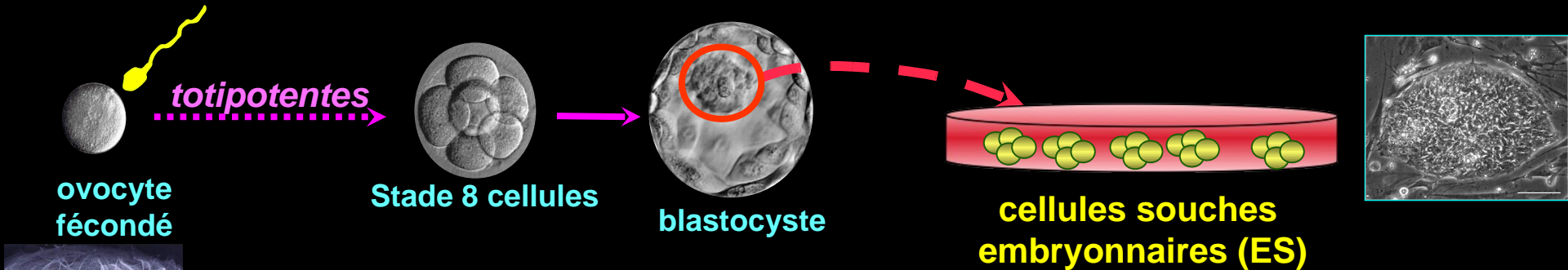


L'absence (KO) de c-myc dans la basale provoque une fragilité sévère d'un épiderme f'n (hyperkératosique), dans les zones de friction et une différenciation prématurée. Appauvrissement en CS et réparation cutanée déficiente.

Les niveaux d'expression de Myc inf uencent le devenir des CSE.

homéostasie Surexpression de c-Myc Absence de c-Myc

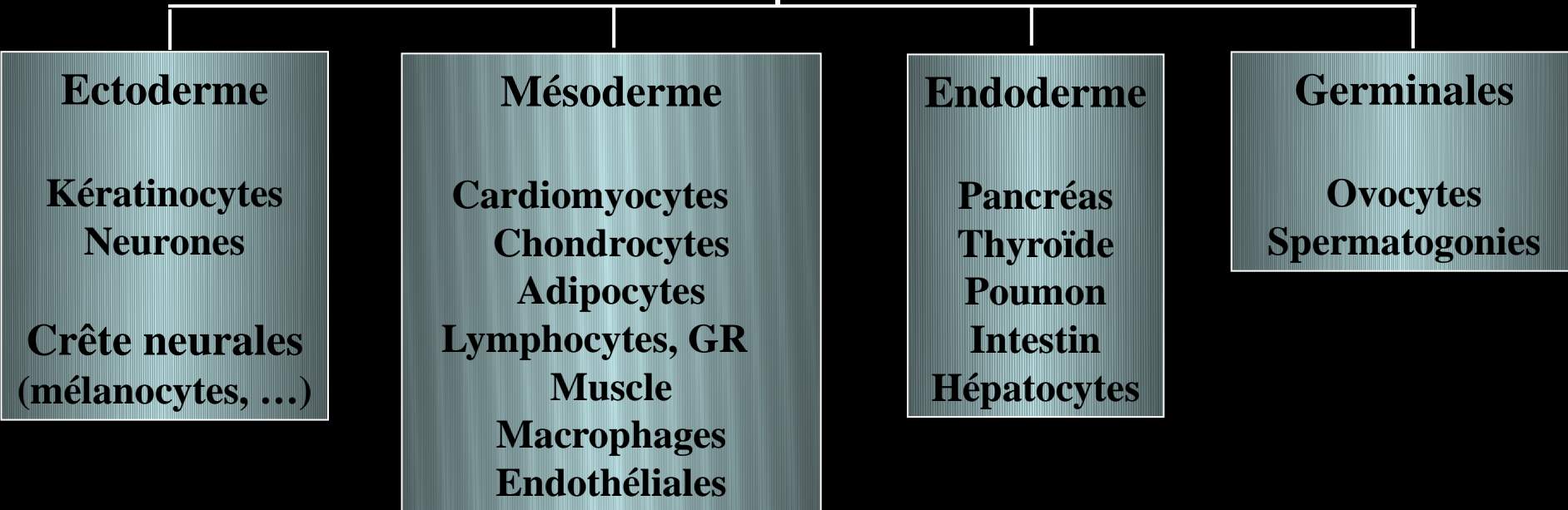


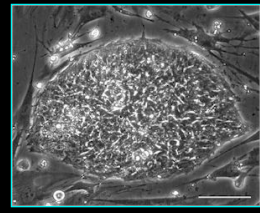
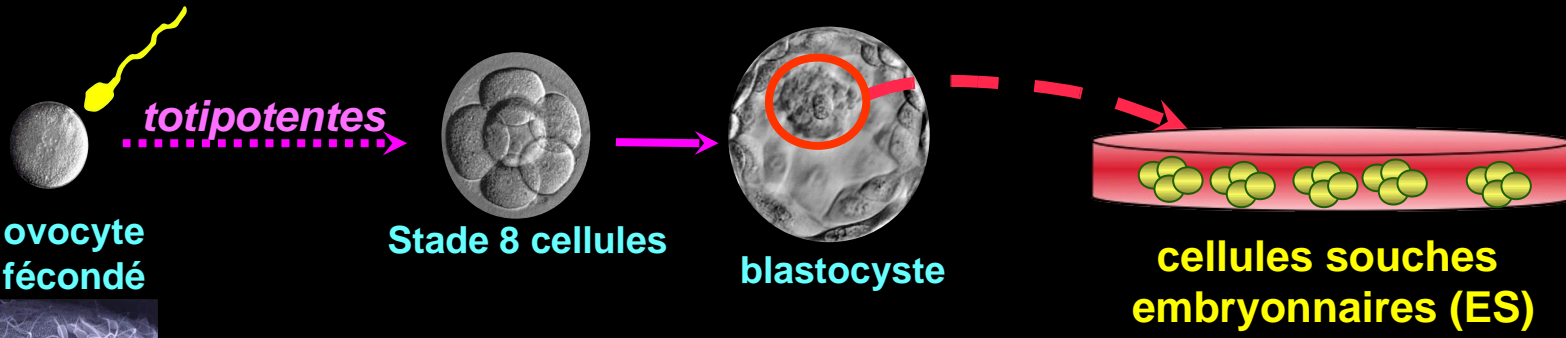


auto-renouvellement

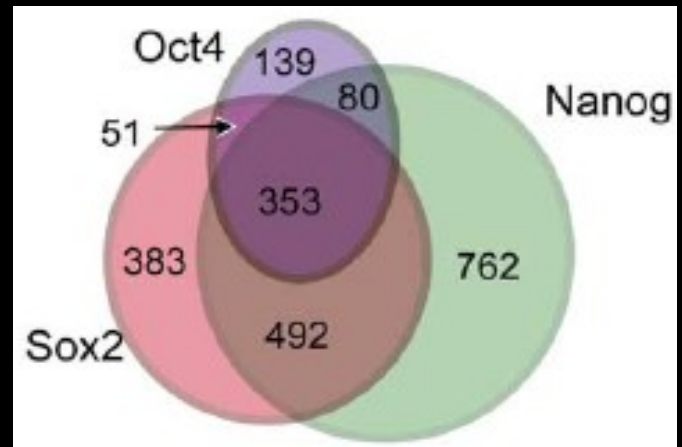
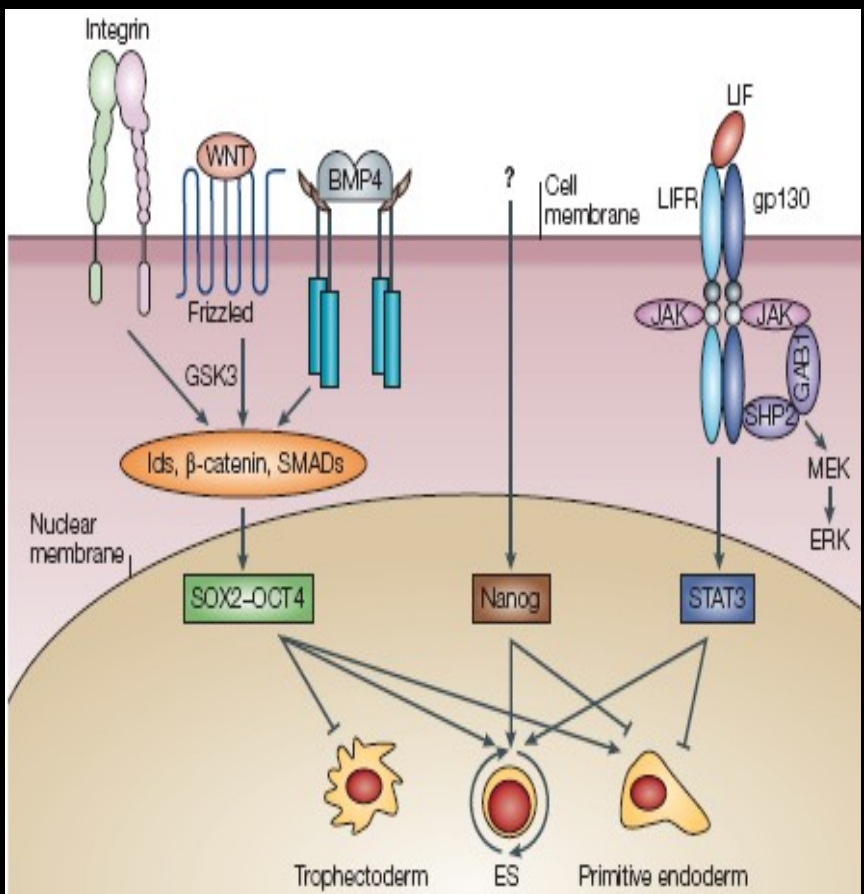
oct-4, nanog, sox-2
activité télomérase élevée

pluripotence

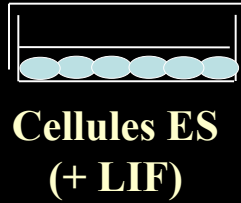
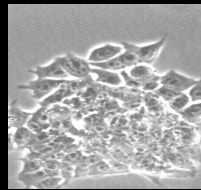




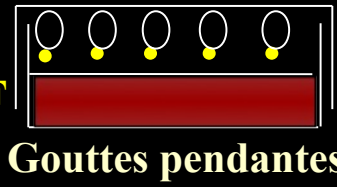
auto-renouvellement
oct-4, nanog, sox-2
activité télomérase élevée



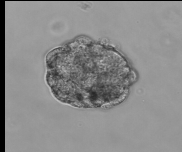
Pluripotence des cellules couches embryonnaires (I)



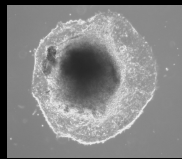
- LIF



0



3



5

Jours de culture et de différenciation

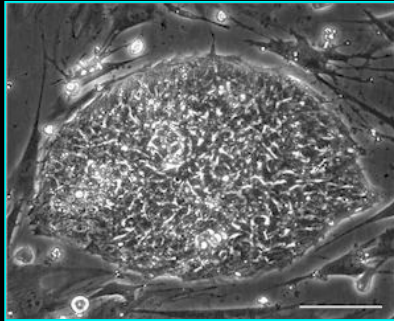
20

Ectoderme
(feuillet externe)
Cellules épidermiques
Cellules neuronales

Mésoderme
(feuillet médian)
Cellules cardiaques
Cellules musculaires
Globules rouges...

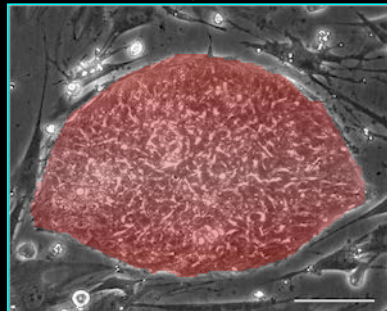
Endoderme
(feuillet interne)
Cellules pancréatiques
Cellules thyroïdiennes
Cellules pulmonaires

Pluripotence des cellules couches embryonnaires (II)

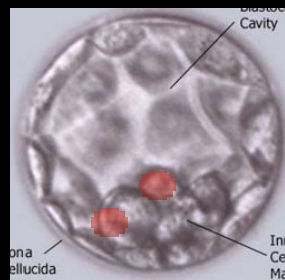


Cellules ES

Recombinaison
homologue



Cellules ES
dont un gène est modifié



Injection dans le
blastocyste

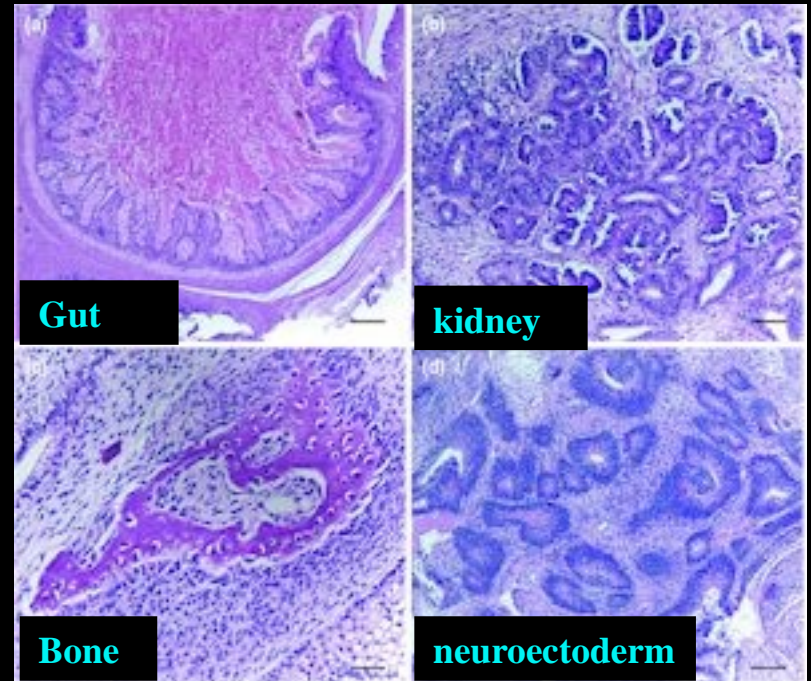
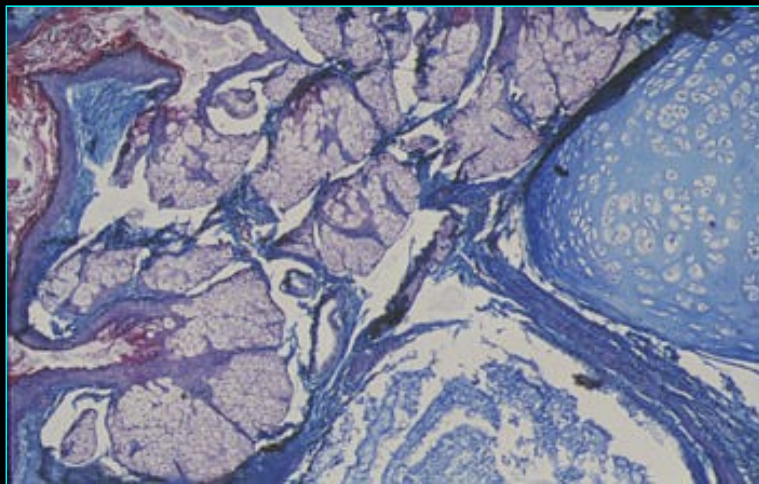
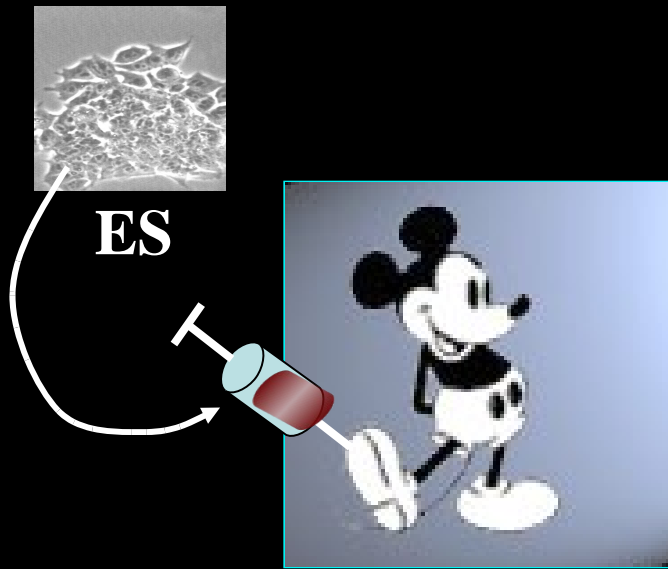


souris
chimérique



Femelle
porteuse

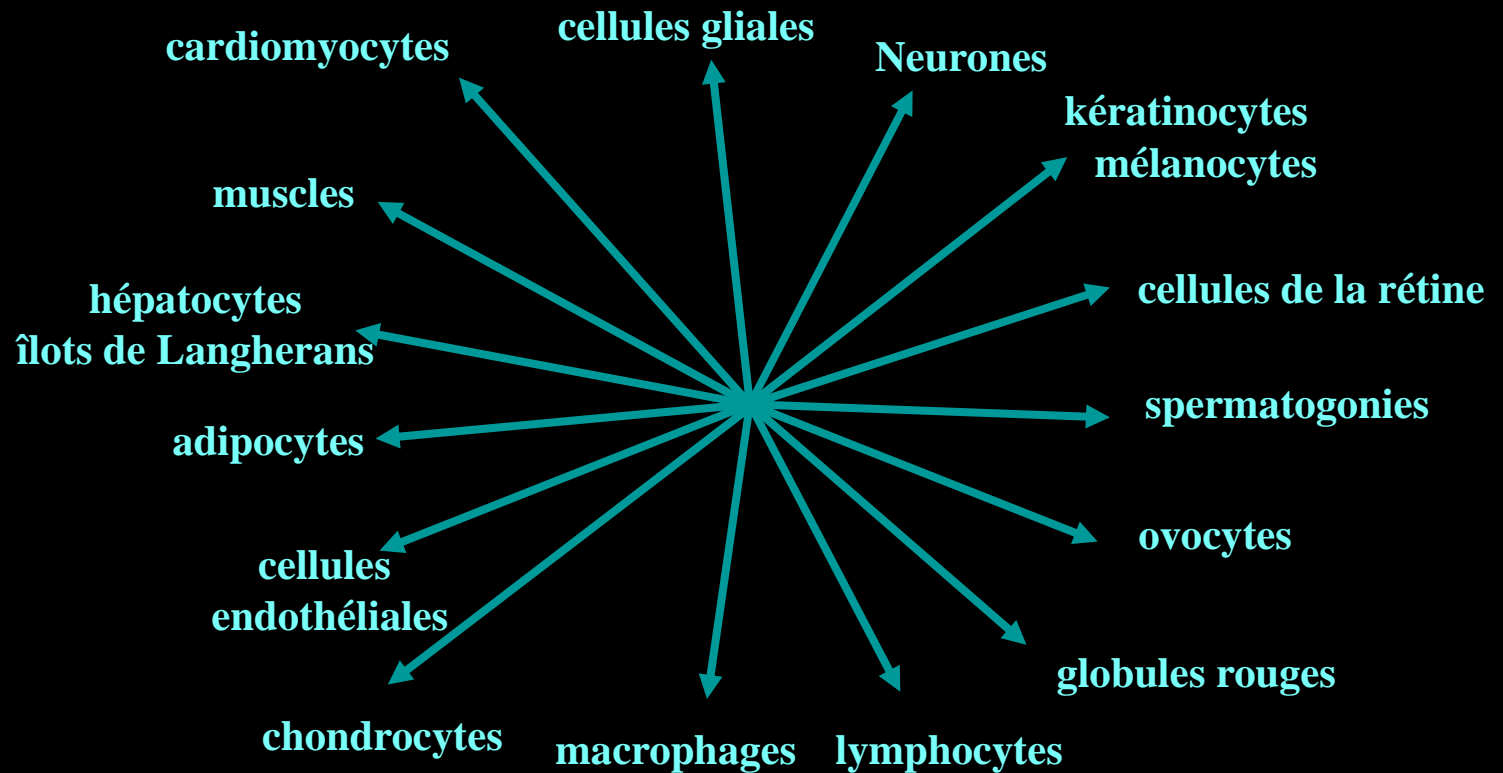
Pluripotence des cellules couches embryonnaires (III)



Tératome: Tumeur bénigne ou maligne formée à partir de tissus multiples étrangers à la région qui l'entoure

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

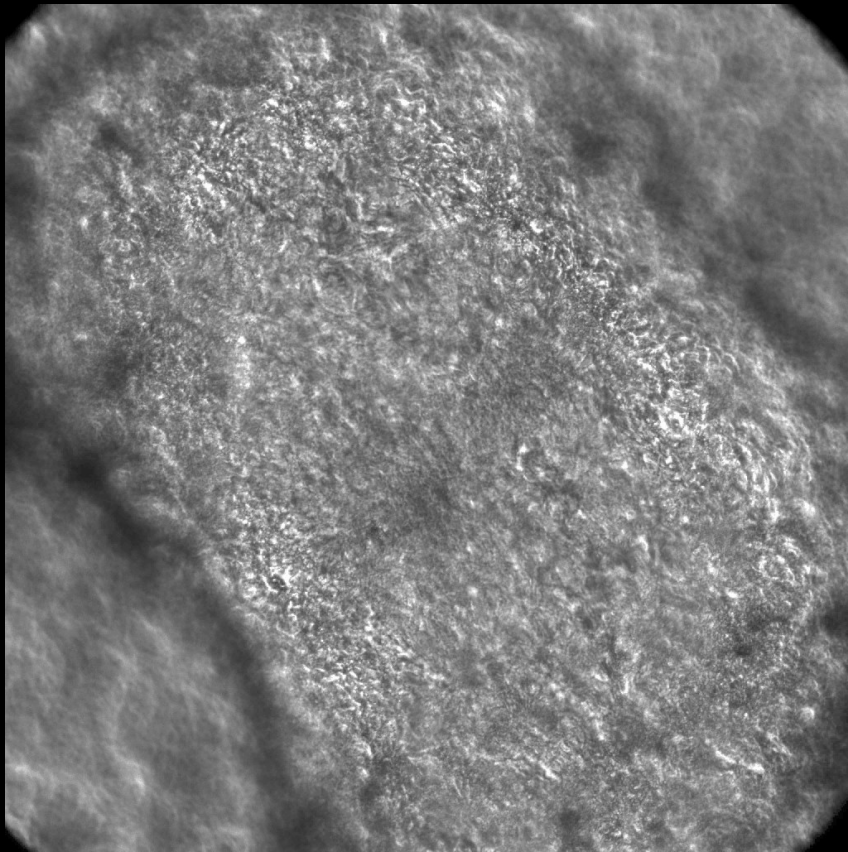
James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,
Jeffrey M. Jones



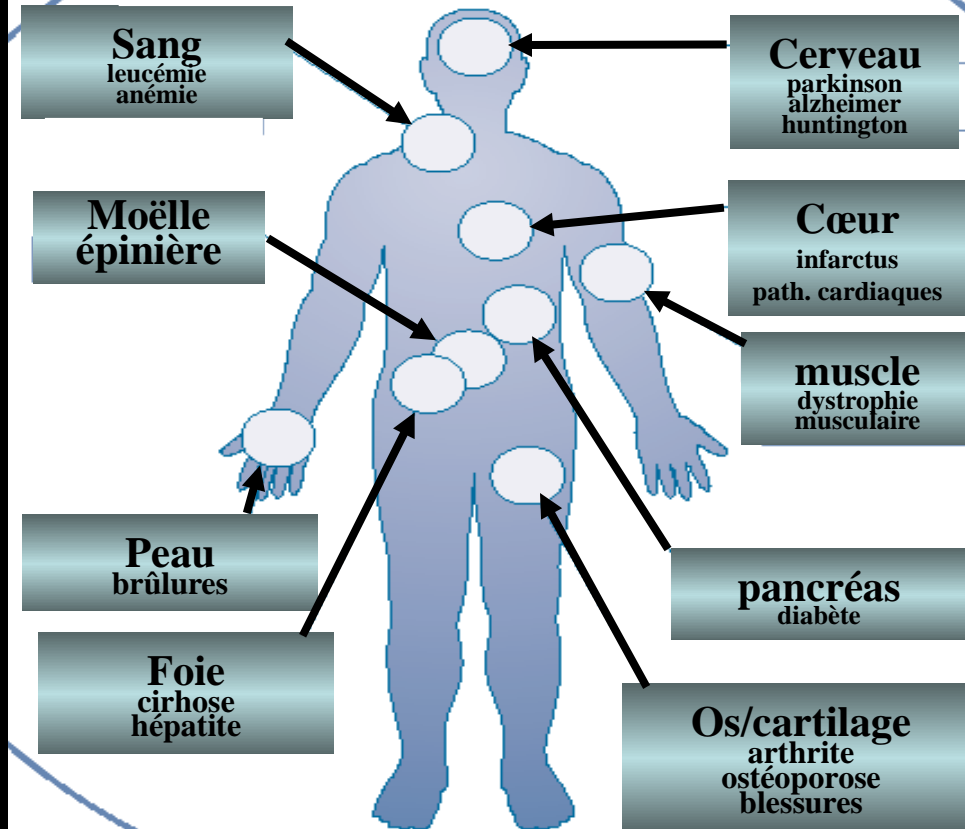
Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human

Blastocysts Sciences 1998

James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,
Jeffrey M. Jones



Potentiel thérapeutique des cellules ES

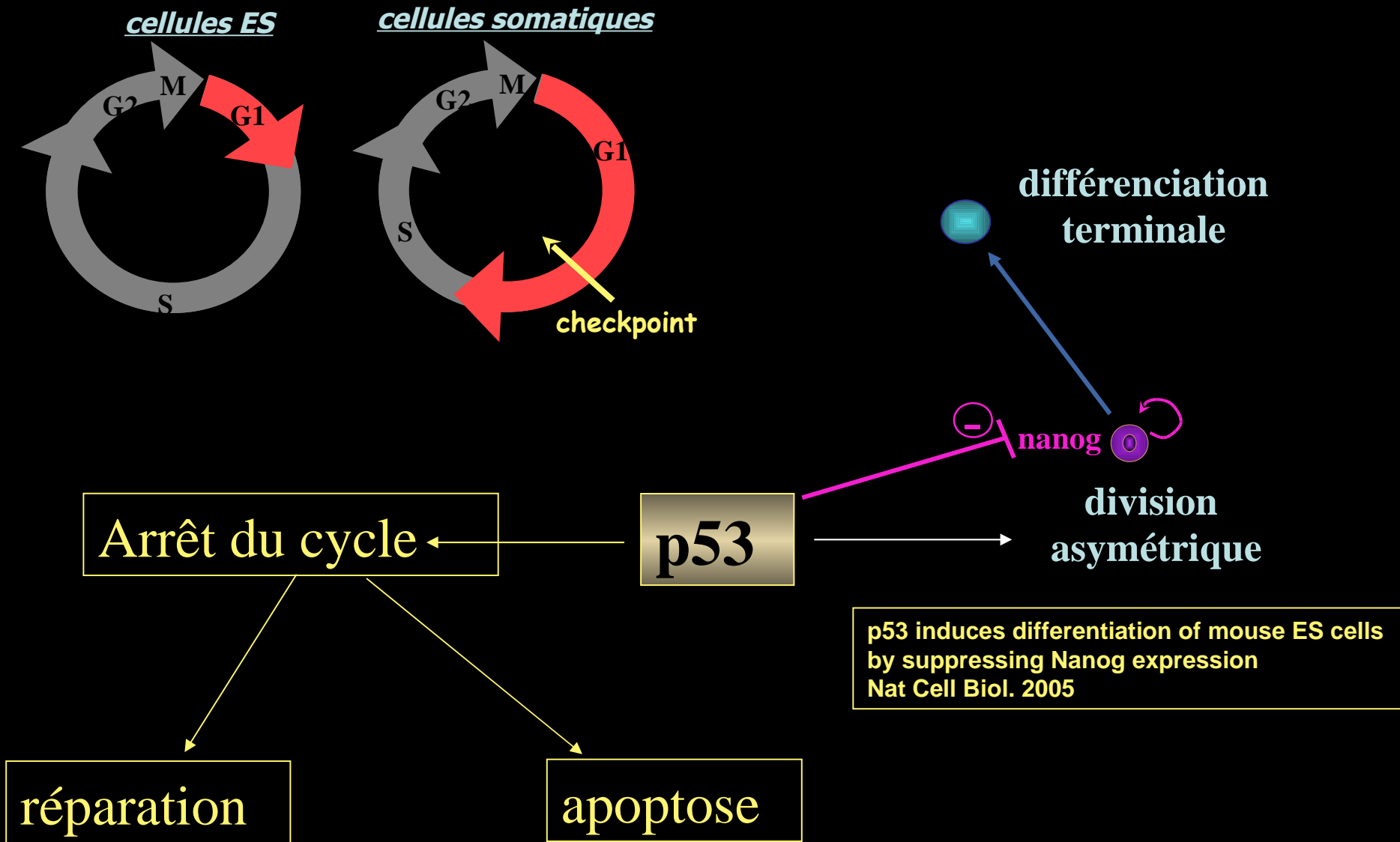


Applications of ES-based cell therapy

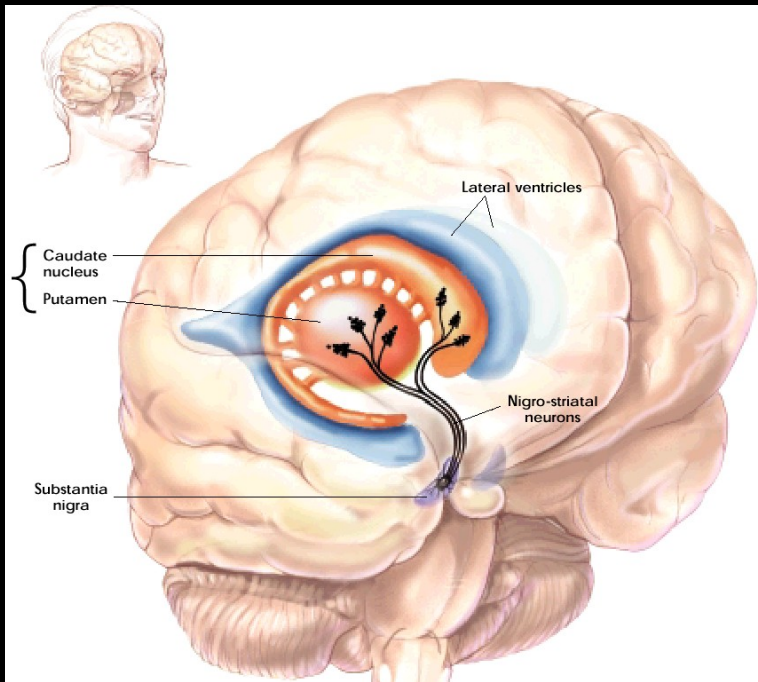
- ES-derived cardiomyocytes into infarcted rat heart (Klug et al. 1996 JCI 98,216)
- ES-glial precursors into myelin-def. rats (Brüstle et al. 1999 Science 285,754)
- hES-derived neuronal into motoneuron-injured rats (Donovan et al. 2001 Nature 414,92)
- ES-derived pancreatic beta cells into diabetic mice (Hory et al. 2002 PNAS 99,16105)
- ES-derived neuronal into Parkinson mice (Kim et al. 2002 Nature 418,50)
- Undifferentiated ES cells into infarcted rat heart (Behfar et al. 2002 FASEB J. 16,1558)



p53, le gardien du génome



La maladie de Parkinson



Prévalence:

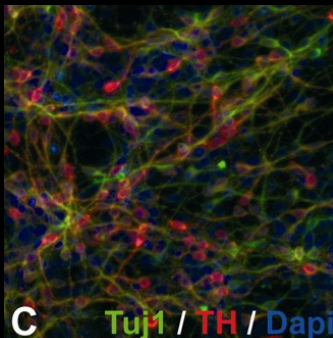
~ 100 000 patients en France

Symptômes:

*Tremblements,
Rigidité musculaire,
Ralentissement des gestes (akinésie, bradykinésie)
Instabilité posturale*

Pathologie:

*Perte des neurones dopaminergiques de la
substance noire (pars compacta)*



Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease

J KIM*, J M. AUERBACH*†, J A. RODRÍGUEZ-GÓMEZ, I VELASCO, D GAVIN, N LUMELSKY, S LEE†, J NGUYEN†, R SÁNCHEZ-PERNAUTE†, K BANKIEWICZ† & R MCKAY NIH, Bethesda. *Nature* 418, 50 - 56 (2002)

Modèle animal de la maladie de Parkinson:
Administration de 6-OH-DA dans le striatum détruit les neurones dopaminergiques.

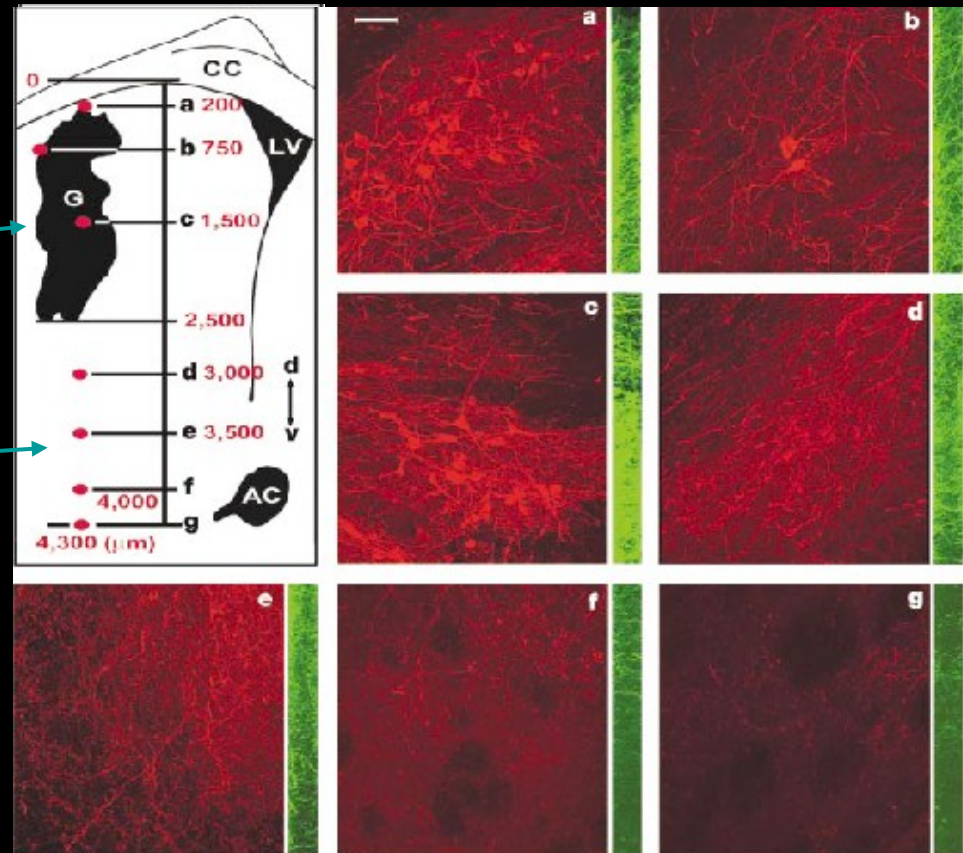
Commutateur de différenciation: promoteur *nurr-1* + SHH + FGF8:

- Isolement de neurones DOPA (78%)
- Injection des cellules dans le striatum.

Marquage anti-Tyrosine Hydroxylase (TH).

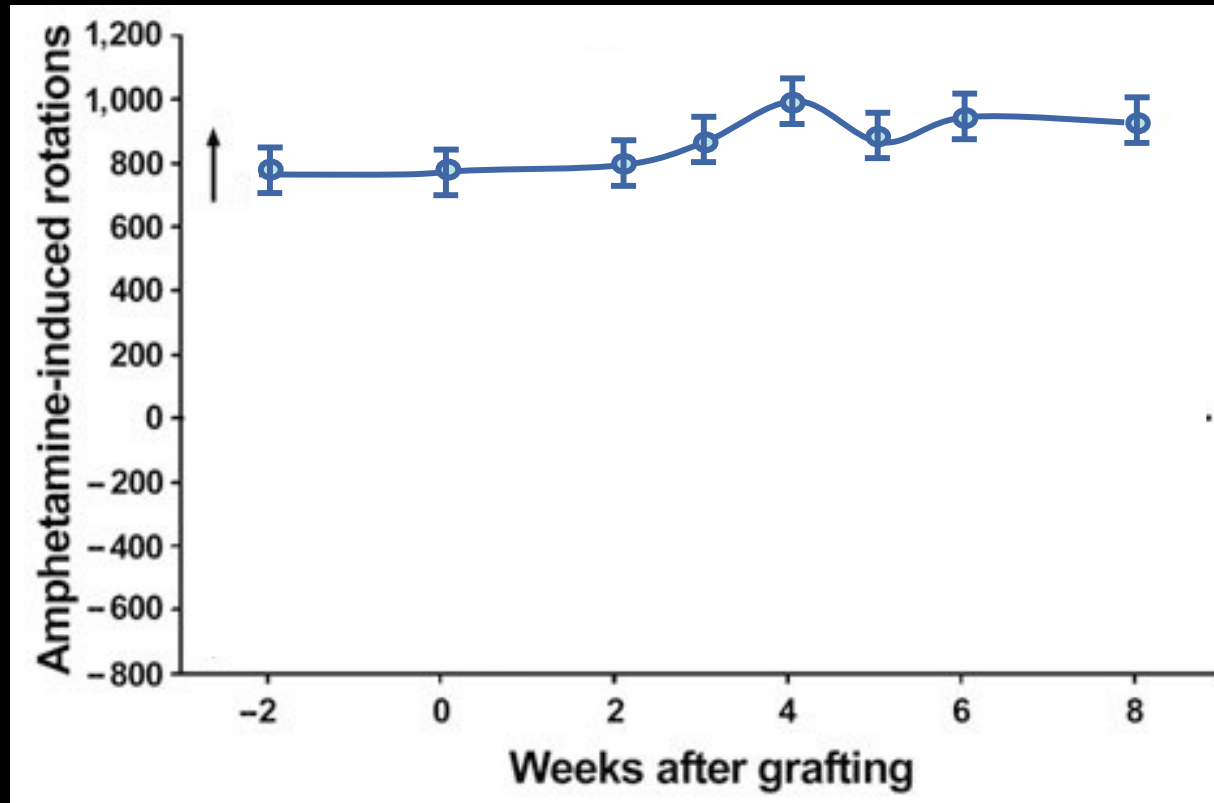
On retrouve les corps de cellules ES TH⁺ dans la région de la greffe (a-c)

mais des prolongements dans le parenchyme du striatum hôte jusqu'à 2 mm de la greffe (d-g).



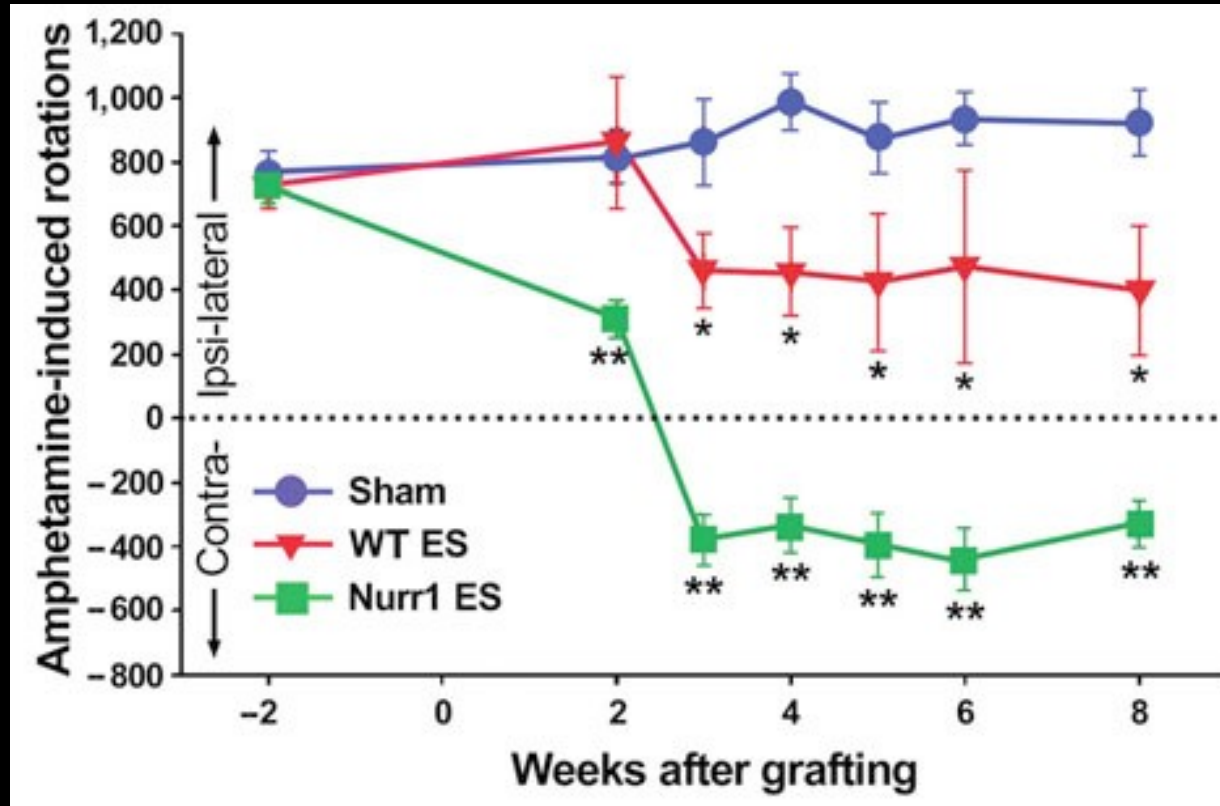
Administration d'amphétamine aux animaux lésés par le 6-OH-DA induit une rotation autour du site d'injection.

800 rotations/70 min
1 rotation/5 sec



Administration d'amphétamine aux animaux lésés par le 6-OH-DA induit une rotation autour du site d'injection.

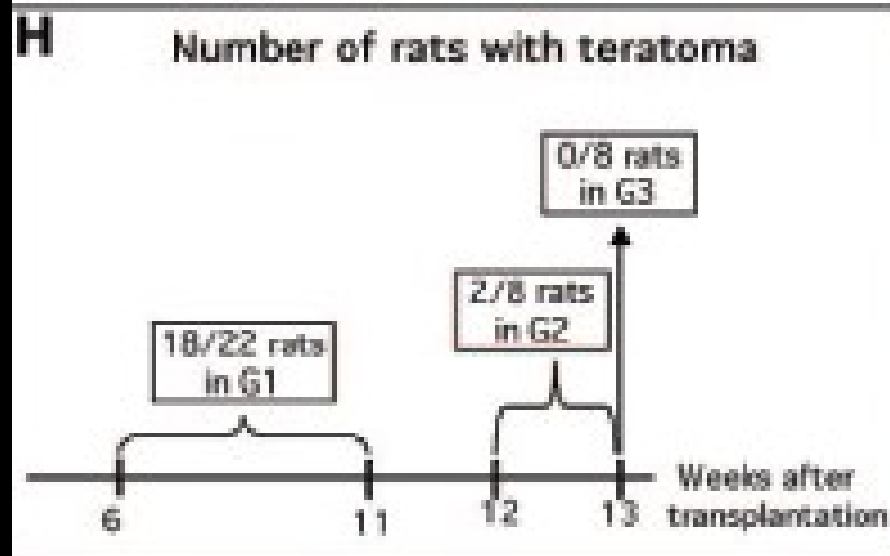
800 rotations/70 min
1 rotation/5 sec



By demonstrating efficacy while avoiding tumour formation, Kim *et al.* have achieved a [proof of principle](#), although ES cells that have been genetically modified in this way might not be desirable for use in people.

Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation

ANKE BRIDDERLAU,^a ANA SOFIA CORREIA,^b SERGEY V. ANEIMOV,^b MUNA ELMI,^a GISENE PAUL,^b
LAURENT ROYDON,^b ASUKA MORIZANE,^c FILIP BEEGQUET,^d ILSE REIER,^d ULF NANNMARK,^a
MANOLO CARDA,^b ERIC HANSE,^d JUN TAKAJASHI,^e YOSHIKI SASAI,^e KEIKO FUNA,^a PATRICK BRUNDIN,^b
PETER S. ERIKSSON,^f JIA-YI LI^b



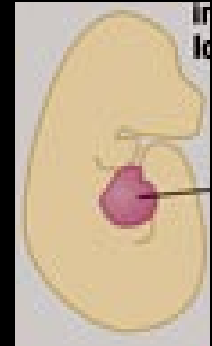
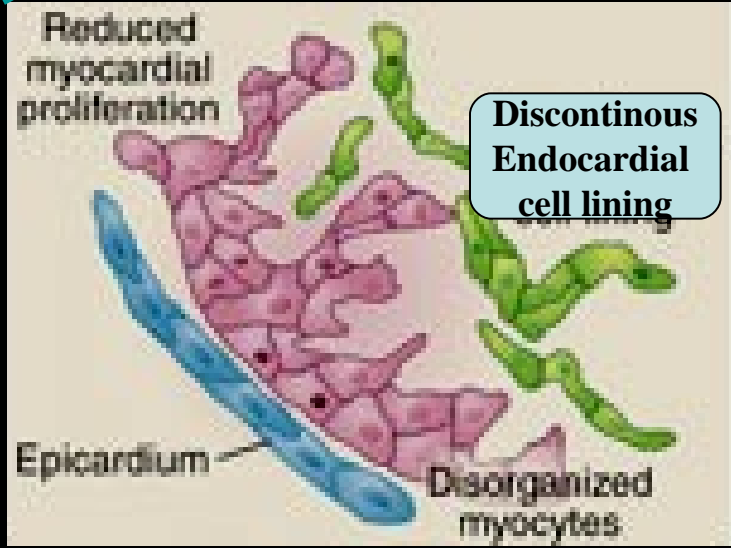
Rescue of Cardiac Defects in *Id* Knockout Embryos by Injection of Embryonic Stem Cells

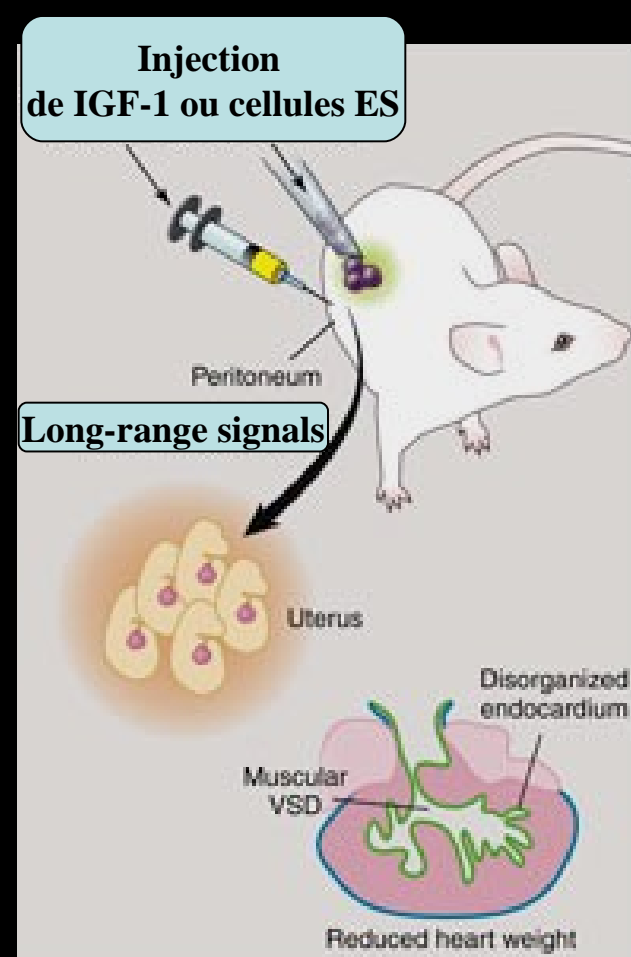
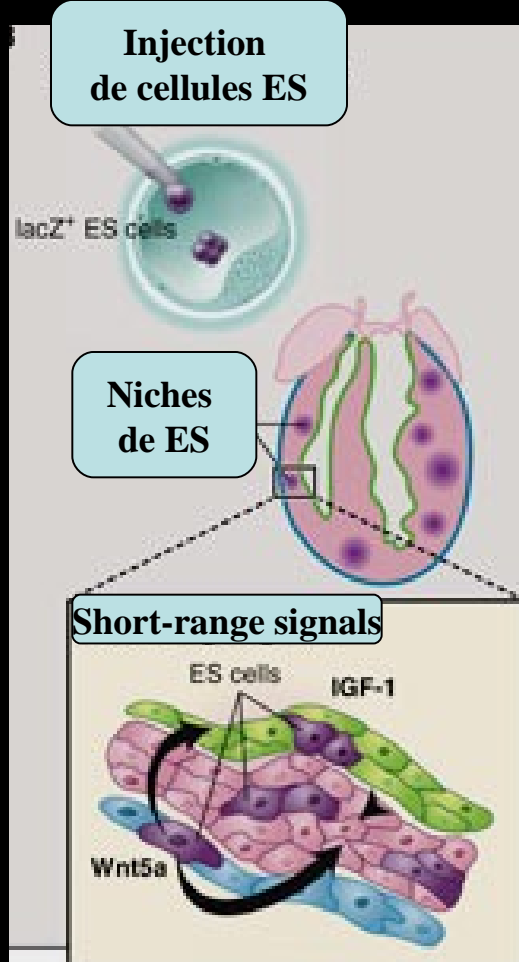
Diego Fraidenraich,¹ Elizabeth Stillwell,¹ Elizabeth Romero,¹
David Wilkes,³ Katia Manova,² Craig T. Basson,³ Robert Benezra^{1*}

Embryos lacking the *Id1*, *Id2*, and *Id3* genes display multiple cardiac abnormalities and die around E13.5.



Reduced myocardial proliferation





B. Injection of a small number of wild-type ES cells carrying a lacZ marker into Id mutant blastocysts resulted in about **20% chimerism** of heart tissue and complete rescue of the Id mutant phenotype.

C. **Wnt5a**, a locally secreted factor, and **IGF-1**, a bloodstream factor that promotes myocyte proliferation--were identified as potential candidates involved in the rescue process.